

Numéro d'enregistrement

au C. N. R. S.

A. O. 3800

THESES DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES APPLIQUEES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

de **PARIS**

par

Jean-Louis MULTON

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

*

Première Thèse : Contribution à l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté.

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **15 Décembre 1969**

devant la Commission d'Examen

M. CHOUARD Président

M. DERVICHIAN

M. GUILBOT

} Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551519_0035

Numéro d'enregistrement

au C. N. R. S.

A. O. 3800

THESES DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES APPLIQUEES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Jean-Louis MULTON

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

*

Première Thèse : Contribution à l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté.

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 Décembre 1969

devant la Commission d'Examen

M. CHOUARD

Président

M. DERVICHIAN

M. GUILBOT

}

Examineurs



A mes Parents

A ma Femme

A mon Fils

en témoignage de mon affection

- A V A N T - P R O P O S -

L'occasion qui m'est donnée ici de remercier tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail est précieuse parce qu'elle est unique et qu'elle reçoit en quelque sorte une consécration officielle.

Aussi m'est-il particulièrement agréable d'exprimer mon profond remerciement et ma très grande gratitude à Monsieur GUILBOT, Directeur de Recherches à l'INRA, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-chimie des céréales. Je lui dois tout d'abord d'être entré à l'INRA, et de m'avoir toujours aidé, à tout point de vue et avec la plus grande compréhension, dans la carrière de chercheur scientifique ainsi choisie ; je lui dois ensuite de m'avoir proposé un sujet de recherche dont l'intérêt propre est très grand, mais qui, de plus, se situe dans un contexte très ouvert vers l'extérieur.

En ce qui concerne plus précisément ce travail, j'ai constamment trouvé auprès de M. GUILBOT l'aide et les conseils les plus attentifs, tant pour la conception de l'expérience et son interprétation, que pour la rédaction des résultats.

Qu'il trouve donc ici l'expression des sentiments de respectueuse et reconnaissante amitié que je lui porte.

Ma profonde reconnaissance va à Monsieur le Professeur CHOUARD, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, pour la confiance qu'il m'a prodiguée en acceptant le patronage de ce travail, et pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le Jury.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur DERVICHIAN, Chef de Service de l'Institut Pasteur pour l'intérêt qu'il m'a manifesté au cours de ce travail et pour avoir bien voulu accepter la charge d'en être le rapporteur.

Je tiens à exprimer ici mes remerciements à Monsieur GOMARIN, Directeur du Service Scientifique des Ets. Air-Industrie pour les précieux conseils qu'il m'a donnés quant aux aspects thermodynamiques.

Je voudrais également dire toute ma reconnaissance à Monsieur BONASTRE, Ingénieur Agronome, Directeur de l'ENSIA, et à Monsieur BURÉ, Ingénieur Agronome, Professeur à l'ENSIA qui l'un et l'autre ont su guider mes pas d'étudiant vers la carrière de chercheur.

Que Monsieur SACH, Chef de Service aux Laboratoires CHOAY, trouve ici l'expression de mes remerciements pour les conseils et l'aide matérielle qu'il m'a donnés.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer toute ma gratitude à Madame DROUET, et à Messieurs BRYON, MARTIN et POPULUS, qui avec beaucoup de conscience et de dévouement malgré des tâches parfois ingrates, m'ont très efficacement aidé dans la réalisation de ce travail.

Que tous ceux enfin qui à des titres divers m'ont apporté leur aide trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

- TABLE DES MATIERES -

INTRODUCTION	page 1
<u>Chapitre I - TRAVAUX ANTERIEURS</u>	3
I - L'affinité des protéines pour l'eau	4
A. Mode de liaison de l'eau	4
B. La courbe de sorption de l'eau	4
1°) Caractéristiques des isothermes de sorption	4
2°) L'eau solvante	5
C. Le rôle de l'eau dans la structure des protéines	6
II - Caractéristiques de la dénaturation des protéines	7
A. Définition et mise en évidence	7
1°) Définition	7
2°) Modifications liées à la dénaturation	8
B. Aspects thermodynamiques	9
C. Aspects cinétiques	11
1°) Réactions en une phase	11
2°) Réactions à plusieurs phases distinctes ...	12
3°) Modifications possibles de la cinétique ..	14
III - Rôle de l'eau dans la dénaturation en milieu solide	14
A. Effets qualitatifs et quantitatifs de la teneur en eau sur la dénaturation des protéines.....	14
1°) Effets observés sur des protéines simples.	14
2°) Effets observés sur un processus complexe. d'altération biologique : la perte de viabilité des semences	15
B. Rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation	16
Conclusion	18
<u>Chapitre II - CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	19
I - Matériel biologique utilisé	19
A. Blé	19
B. Préparations de ribonucléase et d'acide ribonucléique	19

II - Méthodes utilisées et mises au point	page 22
A. Dosage de l'eau	22
B. Mesures d'humidité relative de l'air	22
C. Détermination de l'affinité pour l'eau (sorption) des produits étudiés	22
1°) Première méthode	22
2°) Deuxième méthode	22
D. Dosage du taux de protéines	23
E. Dosage des groupes sulfhydriles et des ponts disulfures	23
F. Dosage de l'activité ribonucléasique globale extractible du blé	25
G. Dosage de l'activité protéolytique	26
H. Dosage de l'activité amylasique	26
I. Détermination du temps moyen de germination	26
III - Description et étude critique des protocoles expérimentaux	28
A. Description des protocoles expérimentaux	28
1°) Dans le cas du blé	28
a) Conditionnement de l'échantillon	28
b) Réalisation du choc thermique	30
2°) Dans le cas de la RNase pancréatique	32
B. Etude critique des protocoles expérimentaux	32
1°) Etude physique du choc thermique	32
a) Vérification de la constance de la teneur en eau au cours du choc thermique	32
b) Etude à l'aide de l'hygromètre SINA de la variation de l'H.R.E. au cours du traite- ment thermique	33
c) Mesures de la pression développée dans l'enceinte pendant le choc thermique	36
α) Dispositif expérimental	36
β) Mesure de la pression dans les enceintes de choc thermique	39
d) Refroidissement des plaques	41
e) Durée des transferts de chaleur	41
f) Conclusions	41
2°) Influence des conditionnements sur les tests pratiqués, en l'absence de choc thermique ..	43
3°) Essais sur RNase pancréatique	43

Chapitre III - RESULTATS OBTENUS page 45

I - Chocs thermiques sur le blé	45
A. Activité amylasique et protéolytique	45
B. Activité ribonucléasique et temps moyen de germination	47
C. Courbe de sorption du blé	54
II - Chocs thermiques appliqués à la ribonucléase pancréatique	58
A. Ribonucléase pancréatique en solution	58
1°) Essais de choc thermique appliqués à une solution de ribonucléase (type III) à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	58
2°) Essais de choc thermique appliqués à une solution de RNase (type III), en fonction de la concentration	58
3°) Essais sur l'influence du degré de pureté de la RNase pancréatique sur la cinétique de dénaturation	60
B. Ribonucléase solide à différents taux d'hydra- tation	60
C. Etude de sorption	63
D. Dosage des groupements SH libres et des ponts S-S	63

Chapitre IV - INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS ET
DISCUSSION GENERALE 68

I - Cinétique de la réaction	68
A. Justification du modèle cinétique choisi	68
1°) Justification du mode d'expression	68
a) Type de réaction étudié	68
b) Hypothèse de travail choisie	69
2°) Justification de l'hypothèse choisie	70
B. Etude de quelques facteurs susceptibles de modi- fier la cinétique de dénaturation	71
1°) Facteur pureté	73
2°) Facteur concentration	75
3°) Facteurs température et teneur en eau	75
a) Teneur en eau	75
b) Température	76
C. Relation entre l'évolution de la dénaturation et la modification de l'état de liaison de l'eau dans le système	78
1°) Variation de l'H.R.E. pendant le choc ther- mique	78

2°) Interprétation des phénomènes observés selon le schéma cinétique à deux étapes d'ELEY et LESLIE (1964)	81
3°) Modification de la courbe de sorption à la suite des chocs thermiques	81
II - Etude thermodynamique de l'état activé	82
A. Calcul de l'énergie d'activation	82
1°) Mode de calcul	82
2°) Résultats des calculs relatifs aux expériences sur le blé	83
a) Résultats	83
b) Discussion	85
3°) Résultats des calculs relatifs à la ribonucléase pancréatique	87
B. Paramètres thermodynamiques de l'état activé ...	88
1°) Mode de calcul	88
2°) Résultats obtenus	88
3°) Discussion des résultats	88
a) Observation	88
b) Signification des paramètres thermodynamiques	94
α) Variation de l'énergie libre ΔF^*	94
β) Variation de l'enthalpie ΔH^*	96
γ) Variation de l'entropie ΔS^*	96
c) Corrélation entre les variations d'entropie et d'enthalpie	98
α) Interprétation thermodynamique	99
β) Interprétation en relation avec l'hypothèse de EYRING et STEARN sur les liaisons impliquées	101
III - Relations observées entre les trois facteurs principaux du choc thermique (teneur en eau, température, durée)	102
A. Aspects statistiques	103
B. Relations entre la température et la durée d'inactivation	103
C. Relations entre la température et la teneur en eau	107
D. Relation entre la teneur en eau et la durée	111
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	114
<u>Annexe</u> - Quelques aspects particuliers des distributions des durées de germination.	119
A. Evolution de la variance	119
B. Evolution du coefficient de variation	122

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

[a]	: concentration du corps a	P _N	: protéine native
b	: constante de BOLTZMANN	P _N [*]	: complexe protéine activée
E.e.m.	: force électro-motrice	P _D	: protéine dénaturée
h	: constante de PLANK	R	: constante des gaz parfaits
k	: constante de vitesse	RNase	: ribonucléase
p.g.	: pouvoir germinatif	s.s.	: substance sèche
A.R.N.	: acide ribonucléique	T	: température absolue
°C	: degré centigrade	T _m	: temps moyen de germination
cu-Co	: cuivre constantan	ΔF	: variation d'énergie libre
E	: énergie d'activation	ΔH	: variation d'enthalpie
I.R.	: humidité relative	ΔS	: variation d'entropie
I.R.E.	: humidité relative d'équilibre	log ₁₀	: logarithme à base décimale
K	: constante d'équilibre	Log	: logarithme népérien
°K	: degré Kelvin	*	: astérisque marquant toutes les grandeurs relatives à l'état activé
P	: protéine		
exp (x)	: exponentielle de x		

Définitions.

Les termes suivants sont utilisés dans le texte avec la définition donnée ci-dessous:

Produits "solides" (ex. RNase solide), par opposition aux mêmes produits en solution. La substance solide est alors caractérisée par sa teneur en eau.

"Choc thermique" ou "choc" : fait de porter dans un temps aussi court que possible une substance à une température donnée, de l'y maintenir une durée déterminée, au bout de laquelle elle est refroidie très rapidement.

- I N T R O D U C T I O N -

Les réactions de dénaturation des protéines dans les milieux solides plus ou moins hydratés ont une importance exceptionnelle dans toutes les industries agricoles et alimentaires. D'une part, il est souvent fait appel dans ces industries à des traitements thermiques, les plus fréquents étant les opérations de séchage, de cuisson et de stérilisation ; d'autre part, toutes les substances alimentaires comportent des protéines en proportion plus ou moins grande.

Les phénomènes de dénaturation conduisent à des modifications très variées - inactivation enzymatique, modification de la solubilité et des propriétés rhéologiques, destruction de micro-organismes, perte de viabilité des semences - qui peuvent dégrader ou améliorer les qualités des produits alimentaires (BIMBENET, GUILBOT, 1966).

Ce problème est particulièrement aigu dans un domaine qui nous est familier, celui du séchage des céréales ; en effet, au cours de cette opération, les risques de dénaturation sont importants et ils ont pour corollaire une perte sensible de la valeur technologique (GUILBOT, MULTON, 1968).

Or, pour des raisons économiques diverses (DAUPHIN, 1963), qui tiennent à la généralisation de l'emploi de la moissonneuse-batteuse, au développement des stockages de longue durée, et à l'extension de l'aire géographique de la culture du maïs récolté toujours très humide, la pratique du séchage des céréales ne cesse de se développer.

Aussi, l'étude de ce problème nous a-t-elle semblé particulièrement intéressante ; en effet, une meilleure connaissance de ces mécanismes de dénaturation en milieu solide devrait permettre de dégager des tests d'altération des grains et de définir des conditions optimales de séchage et de stockage permettant d'aboutir à la conservation, sinon à l'accroissement, de la qualité du produit.

Pour mener à bien ce programme, nous avons pensé qu'il était intéressant de l'aborder selon trois points de vue différents.

Le premier est celui du comportement d'une protéine bien déterminée, la ribonucléase, soumise à un choc thermique dans son milieu biochimique naturel, le grain de blé. Deux raisons nous ont amenés à choisir cet enzyme : d'une part, la ribonucléase est une protéine dont la structure est bien connue et dont la dénaturation peut être suivie très facilement par le dosage de l'activité enzymatique ; d'autre part, BOOTH (1948),

signale que celle existant dans le blé est très sensible à la chaleur, ce qui a conduit à penser que la mesure de son activité pourrait constituer un bon test de sensibilité thermique.

Le deuxième aspect, plus global, plus synthétique, est fourni par une mesure traduisant l'état général des protéines du grain ; la détermination des propriétés germinatives constitue une des meilleures méthodes permettant d'aboutir à ce résultat. Mais la précision et la reproductibilité médiocres des mesures de pouvoir germinatif et d'énergie germinative nous ont conduits à rechercher une méthode plus élaborée ; des études antérieures faites au laboratoire ayant montré l'intérêt que présente l'évolution de la germination en fonction du temps et la connaissance du temps moyen de germination, c'est dans cette voie que nous nous sommes orientés. Enfin, quelques essais de dénaturation réalisés avec la ribonucléase pancréatique solide permettent d'apprécier dans quelle mesure une différence de comportement peut être observée entre la protéine purifiée et séparée de son milieu biochimique normal, et la protéine in situ.

Afin de bien mettre en évidence le rôle de l'eau dans ces phénomènes, la dénaturation thermique doit être étudiée en fonction de la température, de la durée et de l'hydratation de la protéine, le choc thermique étant effectué à teneur en eau constante de la substance pour simplifier l'interprétation.

C'est dans cet esprit qu'a été abordée cette étude. Elle doit représenter une contribution à la connaissance des phénomènes qui se produisent quand la température s'élève dans les milieux biologiques solides plus ou moins hydratés.

Après avoir résumé les principales connaissances antérieures dans ce domaine, nous exposerons les méthodes et les protocoles expérimentaux mis au point ; puis, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus. Enfin, nous nous efforcerons d'en dégager une interprétation du rôle de l'eau dans la dénaturation thermique des protéines en milieu peu hydraté en soulignant les conséquences qui en résultent sur le plan pratique.

- CHAPITRE I - TRAVAUX ANTERIEURS -

Le rôle de l'eau dans les processus biologiques est connu de façon empirique depuis longtemps ; l'une des sept plaies d'Egypte ne fût-elle pas la sécheresse ?

Par contre, ce n'est que récemment que sont étudiés de façon systématique, le mécanisme de fixation de l'eau dans les produits biologiques et le mode d'intervention de ce constituant essentiel des organismes dans les réactions vitales.

Après avoir fait le point actuel des connaissances sur l'affinité pour l'eau des substances biologiques et sur le rôle que celle-ci peut jouer dans les processus vitaux, nous développerons plus en détail certains aspects relatifs à la dénaturation des protéines et à la germination des semences, qui constituent le point de départ des recherches que nous avons entreprises.

I - L'AFFINITE DES PROTEINES POUR L'EAU.

Le phénomène de sorption de vapeur d'eau par les substances biologiques n'est qu'un cas particulier de la sorption des gaz par les solides, dont il existe des études approfondies (BRUNAUER, 1945 ; ROSS et al., 1964 ; GREGG et al., 1967).

On distingue classiquement l'adsorption, ou fixation des molécules gazeuses sur le solide et la désorption qui représente le phénomène inverse.

D'une manière générale, on distingue deux types d'adsorption (EMSCHWILLER, 1951) : l'adsorption "chimique" concerne les gaz dissociés, adsorbés en couche monoatomique et retenus par des forces de liaisons très importantes (covalence, électrovalence), à de très hautes températures ; l'adsorption "physique" s'observe aux basses températures et met en jeu des liaisons faibles de type hydrogène et VAN der WAALS ; l'adsorption de la vapeur d'eau relève de ce seul type "physique".

A. MODE DE LIAISON DE L'EAU.

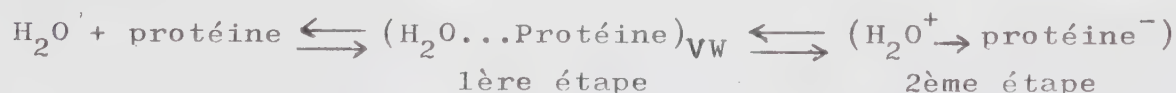
Les molécules d'eau fortement polaires, ont une tendance très marquée à former des liaisons hydrogène, dont les caractéristiques ont été passées en revue encore récemment par SOKOLOV (1965) ; les molécules s'associent entre elles, formant selon la température des agrégats plus ou moins organisés qui rendent compte des propriétés particulières de l'eau, tant au point de vue physique que chimique (PAULING, 1960).

Ces propriétés bien connues de l'eau, font que celle-ci a une affinité toute particulière pour les groupes organiques ou biologiques polaires, avec lesquels elle forme des liaisons hydrogène. Les principaux groupements développant cette affinité sont les groupements carboxyle ($-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{smallmatrix}$), aminé ($-N \begin{smallmatrix} \nearrow H \\ \searrow \end{smallmatrix}$), hydroxyle ($-OH$). L'affinité d'une substance biologique pour l'eau va donc être fonction du nombre de ses groupements polaires et de leur accessibilité. L'énergie de liaison de l'eau sera d'autant plus forte que la distance entre le dipole de l'eau et le groupement polaire sera plus courte.

La molécule d'eau étant capable de former plusieurs liaisons hydrogène, peut réaliser un véritable pont entre deux groupements polaires ; ces molécules peuvent également former des structures complexes en forme de "cage" enfermant d'autres molécules, analogues aux clathrates. On comprend aisément que l'eau puisse ainsi participer puissamment à l'élaboration des structures spatiales des macromolécules comportant des sites polaires, telles que les polyholosides et les protéines.

Outre les liaisons hydrogène, on fait intervenir pour expliquer les phénomènes de cohésion de l'eau, les forces de VAN der WAALS, ou l'un des termes dont elles se composent.

ELEY et LESLIE (1964) ayant observé que la cinétique d'adsorption répond à l'équation de ROGINSKY - ZELDOVITCH, proposent comme mécanisme de la fixation de l'eau, un schéma en deux étapes conforme à cette équation ; la molécule d'eau libre, devrait, avant d'être liée par liaison hydrogène au substrat, passer par une étape intermédiaire où elle serait soumise à des attractions de VAN der WAALS ; il y aurait ainsi deux équilibres successifs :



Pour passer de la première à la deuxième étape, la molécule d'eau doit franchir une barrière d'énergie formée par l'intersection des courbes d'énergie potentielle relatives aux deux états.

B. LA COURBE DE SORPTION

1°) Caractéristiques des isothermes de sorption.

La courbe isotherme de sorption d'eau, à allure sigmoïde dans le cas des protéines, exprime pour une température donnée, l'équilibre qui s'établit entre la teneur en eau de la substance et celle de l'atmosphère qui l'entoure ; la quantité d'eau présente dans l'atmosphère est exprimée par le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau p à la pression de vapeur saturante p_s à la même température, encore appelé humidité relative :

$$H.R. = \left(\frac{p}{p_s} \right)_t$$

Rappelons que l'air humide se comporte comme un mélange de gaz indépendants obéissant aux lois de DALTON, et que l'on considère ces gaz comme parfaits, même quand il s'agit de la vapeur d'eau au voisinage de la saturation.

Certains auteurs préfèrent réserver le terme humidité relative au cas des gaz ; en présence d'une substance hydratée en équilibre avec son atmosphère, les termes "humidité relative d'équilibre" (H.R.E.) (LONCIN, 1961), ou "activité de l'eau" (SCOTT, 1957) sont alors utilisés.

Le réseau d'isothermes obtenu en faisant varier la température montre que l'affinité de l'eau diminue quand la température augmente.

Il existe un phénomène d'hystérésis correspondant au fait que la substance en cours de réhydratation (sorption) montre moins d'affinité pour l'eau qu'en cours de déshydratation (désorption), pour une même H.R.

On trouvera dans DRAPRON et GUILBOT (1962) et GUILBOT (1967) une discussion sur l'interprétation qui peut être donnée de ces courbes, ainsi que sur les phénomènes physiques qu'elles représentent.

2°) L'eau "solvante".

La courbe de sorption a donné lieu à des interprétations très intéressantes, quant à la mobilité et à la disponibilité de l'eau dans les systèmes biologiques.

GUILBOT et LINDENBERG, (1960) ont fait remarquer que cette courbe présente une portion linéaire qui peut être confondue avec la tangente au point d'inflexion ; l'ordonnée à l'origine (H.R. = 0) de la partie linéaire extrapolée définit une fraction d'eau très fortement liée ; la partie linéaire de la courbe correspond à la formation d'une véritable solution solide de l'eau dans la substance répondant à la loi de proportionnalité de HENRY. Au-delà d'une certaine H.R., la courbe s'écarte de la droite : il y correspond une fixation d'eau avec des forces de plus en plus faibles, de nature capillaire ou osmotique.

En extrapolant la fraction linéaire jusqu'à l'H.R. égale à 100 p.100 les mêmes auteurs ont démontré dans le cas de la levure que la quantité d'eau correspondant à la différence d'ordonnée entre la courbe et la partie linéaire extrapolée s'identifie à celle qui a un caractère solvant vis-à-vis des premiers termes des alcools aliphatiques et de l'eau elle-même ; au contraire la quantité d'eau correspondant à l'ordonnée de la droite extrapolée à 100 p.100 d'H.R. est non solvante ; le caractère solvant a été déterminé par la mesure de la répartition, à l'équilibre de diffusion, des différents alcools étudiés (LINDENBERG et ZUILLI, 1952).

Bien que cette observation ne puisse être généralisée sans précaution à d'autres solutés, elle permet de déterminer sur la courbe de sorption à partir de quel seuil d'H.R. apparaît une fraction d'eau solvante et quelle en est la quantité.

L'eau solvante ainsi définie est susceptible de jouer plusieurs rôles dans les systèmes biologiques ; elle peut, d'une part, être un réactif en participant directement à certaines réactions, comme les hydrolyses ; elle peut, d'autre part, servir de véhicule, de milieu solvant où s'effectuent les réactions. On conçoit alors que de nombreuses réactions biochimiques nécessitent une quantité minimale d'eau solvante, véritable seuil en-dessous duquel elles ne peuvent se produire (SCOTT, 1957 ; ROTHE, 1958 ; DRAPRON, GUILBOT, 1962 ; LONCIN, 1965 ; GUILBOT, 1967).

C. LE ROLE DE L'EAU DANS LA STRUCTURE DES PROTEINES.

On s'accorde généralement à considérer que le schéma de la structure des macromolécules protéiques comporte quatre éléments successifs :

- la structure primaire constituée par la séquence des acides aminés, est assurée par les liaisons peptidiques -CO-NH- ;
- la structure secondaire, constituée par l'arrangement hélicoïdal de la chaîne peptidique, est assurée par des liaisons hydrogène :



- les structures tertiaire et quaternaire, constituées par la disposition dans l'espace de l'axe de l'hélice, et par les associations entre ces différentes hélices, sont assurées par des liaisons de covalence (ponts disulfures), des liaisons hydrogène, des liaisons électrostatiques et des liaisons hydrophobes.

La liaison hydrophobe, qui joue en phase aqueuse un rôle considérable, n'est pas une liaison au sens chimique du terme, mais plutôt la résultante des modifications des rapports existant entre l'eau et les groupements polaires et apolaires de la protéine. 35 à 40 p.100 des acides aminés constituant les protéines, comportent des chaînes latérales non polaires qui n'ont aucune affinité pour l'eau. De nombreuses études ont été faites sur la thermodynamique des interactions entre l'eau et des petites molécules apolaires (hydrocarbures) ; mais l'extrapolation de ces résultats au cas infiniment plus complexe des résidus apolaires des protéines se heurte à des difficultés considérables.

Il semble bien que les groupements apolaires modifient l'organisation des molécules d'eau environnantes. Dès 1945, FRANK et EVANS ont émis l'hypothèse que l'eau prend une structure quasi cristalline qu'ils appellent "iceberg", par analogie avec la glace. Cette structure rappelle également celle des clathrates observés par différents auteurs ; (STACKELBERG et MULLER, 1954).

Les théories relatives à la liaison hydrophobe sont encore discordantes ; on trouvera dans YON (1969) une étude détaillée sur ces problèmes. KLOTZ (1958, 1960, 1965) estime que l'effet ordonnateur des groupements apolaires sur l'eau est thermodynamiquement favorable, ces groupements provoquant autour d'eux la formation de structures très ordonnées analogues à des clathrates. L'eau formerait ainsi un espèce de fourreau emprisonnant les groupements apolaires et renforçant la structure de la protéine. Cette théorie est actuellement très contestée (SCHERAGA, 1963, 1965), et on lui préfère l'hypothèse de KAUZMANN (1959). Pour celui-ci l'effet ordonnateur des groupements apolaires sur l'eau environnante est thermodynamiquement défavorable. La molécule tend à prendre une forme compacte telle que le nombre de points de contact eau groupe apolaire soit minimal.

Les groupements apolaires se retrouvent ainsi dans les zones intérieures de la macromolécule où la concentration en eau devient très faible ; ils développent entre eux des attractions de VAN der WAALS qui renforcent la structure plus ordonnée en raison de la présence des groupements polaires à la surface de la molécule.

Les liaisons hydrophobes qui constituent un élément très important de la structure des protéines, ont été étudiées sur des solutions ; on peut se demander dans quelle mesure les conclusions dégagées à partir de ces travaux sont transposables aux milieux solides peu hydratés.

II - CARACTERISTIQUES DE LA DENATURATION DES PROTEINES.

Les aspects généraux de la dénaturation qui vont être évoqués ici, en particulier les aspects thermodynamique et cinétique, sont communs aux milieux liquide et solide.

A. DEFINITION ET MISE EN EVIDENCE.

1°) Définition.

Le terme de "dénaturation des protéines" évoque un ensemble de phénomènes complexes aux aspects très variés, de sorte qu'il est difficile d'en donner une définition simple. On s'accorde en général

(NEURATH, 1963 ; JOLY, 1965) à la définir comme étant toute modification des structures secondaires, tertiaires et quaternaires de la protéine, à l'exclusion de la rupture des liaisons de covalence.

La dénaturation purement thermique des protéines est due au fait que l'énergie cinétique communiquée aux molécules par agitation thermique devient, à partir d'un certain seuil de température, supérieure à l'énergie des liaisons non covalentes ; celles-ci sont rompues, et la structure de la molécule est modifiée.

Les facteurs intervenant dans la dénaturation thermique sont de plusieurs types : la durée d'action, le pH, l'hydratation, à laquelle nous nous intéressons particulièrement ici, et bien sûr la température.

2°) Modifications liées à la dénaturation.

L'altération de la structure des protéines entraîne des modifications correspondantes de certaines propriétés chimiques ou physiques liées à cette structure.

L'étude qualitative et quantitative de ces modifications permet d'ailleurs de suivre et de mesurer la dénaturation. Elles portent principalement sur :

- certaines propriétés physiques : affinité pour l'eau, solubilité, viscosité, absorption des radiations ;
- certaines propriétés biologiques : les caractères immunologiques des protéines et l'activité enzymatique, nécessitant l'intégrité des sites actifs et de la forme de la molécule ; NORTHROP (1932) a mis en évidence le parallélisme rigoureux qui existe entre l'activité enzymatique de la pepsine et de la trypsine et leur dénaturation mesurée par le critère de solubilité.

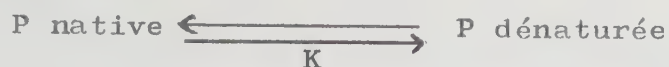
Dans les milieux biologiques complexes, certaines propriétés sont généralement considérées comme directement liées à l'état de dénaturation de l'ensemble des protéines du milieu.

Ainsi, le pouvoir germinatif des semences, le nombre de germes vivants dans une population microbienne, diminuent parallèlement à la dénaturation, du fait qu'ils exigent le bon fonctionnement de nombreux systèmes enzymatiques et l'intégrité de multiples protéines ou nucléoprotéines du cytoplasme. Encore dernièrement HARRISON et al. (1969) soulignent la liaison existant entre le pouvoir germinatif et le taux de protéines solubles du grain de blé.

De même, dans le cas particulier des protéines du blé, on a montré que le volume du pain formé avec du gluten dénaturé est corrélatif du degré de dénaturation de ce dernier (BECKER et SALLANS, 1956).

B. ASPECTS THERMODYNAMIQUES.

Dans le cas où la réaction de dénaturation est réversible, au sens thermodynamique du terme, elle donne lieu à un équilibre :



dont la constante K peut être mesurée à toutes les températures. Les variations d'enthalpie, ΔH , d'entropie, ΔS , et d'énergie libre ΔF , entre les deux états, natif et dénaturé, peuvent être calculées facilement.

STEARN (1938, 1949) a montré que la théorie des états de transition due à EYRING (1935, 1939) permet de calculer les paramètres thermodynamiques de l'état activé, relatifs aux réactions de dénaturation, réversibles ou non.

Considérons la réaction :



où k est la constante de vitesse en s^{-1} :

Selon la relation d'ARRHENIUS, la variation de la constante k en fonction de la température est représentée par l'équation :

$$\text{Log } k = \text{Log } A - \frac{E}{RT}$$

où A est une constante.

E est l'énergie d'activation correspondant à la formation, déjà entrevue par ARRHENIUS, de molécules activées en équilibre vrai avec les molécules du produit, et seules susceptibles de réagir pour donner les produits finaux de la réaction :



où * représente l'état activé.

K^* est la constante d'équilibre du complexe activé.

D'après les travaux d'EYRING, les constantes k et K^* sont reliées par la relation :

$$k = \frac{bT}{h} K^*$$

où b est la constante de BOLTZMANN

h est la constante de PLANK

T est la température absolue.

En remplaçant K^* par sa valeur dans l'expression classique donnant la variation de l'énergie libre correspondant à l'équilibre, il vient :

$$\Delta F^* = - RT \text{ Log } K^* = - RT \text{ Log } \frac{h}{bT} k$$

Ecrivant par ailleurs que $\Delta F^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$, à pression et température constantes.

ΔH^* étant la variation d'enthalpie et ΔS^* la variation d'entropie au cours de l'activation,

il résulte :

$$k = \frac{bT}{h} \exp(-\Delta F^*/RT) = \frac{bT}{h} \exp(\Delta S^*/R) \times \exp(-\Delta H^*/RT)$$

On montre facilement que l'énergie d'activation d'ARRHENIUS s'identifie à la variation d'enthalpie à un facteur près :

$$E = \Delta H^* - RT$$

Ces équations permettent de calculer tous les paramètres thermodynamiques de l'état activé à partir des mesures expérimentales de E, de k et de T :

$$\Delta F^* = RT \log \frac{bT}{kh}$$

$$\Delta H^* = E - RT$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T}$$

De nombreuses données sur les paramètres thermodynamiques de l'état activé relatifs à la dénaturation des protéines ont été publiées.

STEARN (1938, 1949), remarque en particulier que les énergies libres d'activation demeurent relativement constantes dans toutes les dénaturations, avec un écart maximal de 20 p.100 entre les valeurs extrêmes.

Selon cet auteur, le phénomène de dénaturation correspondrait à deux types de liaisons rompues :

- des liaisons faibles (liaisons hydrogène) entraînant une variation d'enthalpie de 4000 ou 5000 cal/mole et une variation d'entropie de 12 unités.
- des liaisons fortes (liaisons de covalence S-S) exigeant une variation d'enthalpie beaucoup plus grande : 20.000 cal/mole, mais pratiquement sans variation d'entropie.

La variation d'enthalpie relative au phénomène d'activation est relativement faible, ce qui indique que la structure de la molécule est peu modifiée, mais se trouve amenée à la limite de la rupture ; par contre, il y a une grande variation d'entropie qui suit l'activation et conduit à la molécule dénaturée, correspondant à un effondrement de la structure dans son ensemble.

Le tableau suivant montre deux exemples de ces effets thermodynamiques dans le cas d'une dénaturation réversible :

Tableau 1 - Entropie (en cal/mole. °K) de dénaturation.

(A) selon ANSON, MIRSKY et PACE, cités par STEARN (1959)

(B) selon KUNITZ (1948).

ORIGINE	EQUILIBRE	ETAT ACTIVE ΔS^*	
		Dénaturation (1)	Réactivation (2)
Trypsine 323 °K (A)	213,1	44,7	- 168,4
Inhibiteur tryptique(B) 30 à 60°C	180	95	- 84

LEFFLER (1955) a montré que pour une série de réactions d'un même type, en chimie organique, il existe une relation linéaire entre ΔH^* et ΔS^* , de la forme, $\Delta H^* = \Delta H_0^* + \beta \Delta S^*$ où β est la température isocinétique.

En considérant la relation thermodynamique classique $\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$, on remarque que, lorsque $T = \beta$, $\Delta G^* = \Delta H_0^*$

YON (1969) vérifie que cette relation s'applique parfaitement aux très nombreuses données connues sur la dénaturation des protéines en solution aqueuse. La température isocinétique est dans ce cas de 60°C: à cette température, la dénaturation de toutes les protéines se produirait à la même vitesse ; cette interprétation n'est pas sans soulever de grandes difficultés, au moins dans le cas des protéines, comme le souligne YON.

C. ASPECTS CINETIQUES.

On considère souvent que les réactions de dénaturation des protéines sont des réactions monomoléculaires d'ordre 1 ; la vitesse de réaction s'exprime donc par : $v = - \frac{dc}{dt} = k.c$ où c est la concentration instantanée en molécule native, t la durée et k la constante de vitesse.

En intégrant, il vient :

$$\text{Log } \frac{c}{c_0} = kt$$

Quand la réaction correspond à ce modèle, on observe une droite de pente k en portant $\text{Log } \frac{c}{c_0}$ en fonction du temps ; cette propriété est classiquement utilisée pour résoudre les problèmes de stérilisation.

Cependant, il n'est pas rare de trouver des réactions de dénaturation qui n'obéissent pas à cette loi linéaire ; JOLY (1965) souligne d'ailleurs ce fait, déjà signalé par SOMMER (1932). Les interprétations qui sont alors données de la cinétique font appel à l'un des deux schémas suivants :

1°) Réactions en une phase.

Pour certains la réaction comporte une phase unique, plus complexe que celle de la réaction d'ordre 1.

Ainsi LAUFFER et CARNELLY (1945) indiquent que l'inactivation de la PR-8-hémagglutinine du virus Influenza A, peut être analysée comme une réaction d'ordre $3/2$.

WOESE (1956) signale l'interprétation possible de courbes d'inactivation comme étant la somme à tout instant de deux réactions d'ordre 1, selon le modèle $n/n_0 = a \exp. (-k_1 t) + b \exp. (-k_2 t)$, où $a + b = 1$.

GAJEWSKA et SHUGAR (1955, 1956) parlent d'une réaction d'ordre supérieur à 3 obtenue avec une solution de ribonucléase.

Parfois un mécanisme d'équilibre est invoqué entre les deux formes de la protéine : Protéine active $\rightleftharpoons$ Protéine inactive, phénomène qui limiterait la réaction à un niveau fonction de la température et défini par la constante d'équilibre. C'est le cas des travaux de ANSON (1934) et de KUNITZ (1948) sur la trypsine et l'inhibiteur trypsique ; cette même interprétation donnée par POLLARD (DUCHESNE, 1964) pour l'invertase, paraît plus discutable ; en effet, d'une part les expériences n'ont pas toujours été poursuivies assez longtemps pour être sûr que l'équilibre ait été atteint, d'autre part, contrairement aux travaux précédents, il ne semble pas que la réversibilité de la réaction (récupération de l'activité enzymatique perdue) ait été vérifiée.

2°) Réactions à plusieurs phases distinctes.

De nombreux auteurs admettent que la réaction présente au moins deux phases successives bien distinctes ; la première phase de dénaturation, très rapide, est suivie d'une phase plus lente, chacune étant considérée en général comme ayant l'ordre 1. Ce type de cinétique a été mis en évidence sur des matériels biochimiques très variés (microorganismes, virus, toxines, enzymes) où la dénaturation peut affecter non seulement les protéines, mais encore les acides nucléiques.

Les explications données par les auteurs à l'existence de deux phases distinctes ressortissent toutes à l'un des deux mécanismes suivants, sans d'ailleurs qu'aucune preuve expérimentale soit réellement donnée.

a) La substance dénaturée, hétérogène, comporte deux ou plusieurs éléments qui se dénaturent à des vitesses différentes ; il peut s'agir de deux souches mélangées de virus, ou de deux espèces chimiques différentes (acides nucléiques et protéines par exemple), ou même de deux types voisins de protéines.

Ainsi, PENCE et al. (1953) relèvent au cours de la dénaturation du gluten de blé une première phase d'ordre 1 suivie d'une phase du second ordre et donnent comme explication les nombreux composants du gluten qui se dénaturent simultanément ; avec la seule gliadine les mêmes auteurs trouvent, après une phase de latence de 6 minutes, une dénaturation d'ordre 1 en une seule phase.

CARTWRIGHT et LAUFFER (1958) postulent l'existence de deux composants dans la toxine botulinique type A ; KAPLAN (1958) avec le virus vaccinia, BACHRACH (1957) avec le virus de la maladie "Foot and Mouth", invoquent eux aussi l'existence de souches ayant des thermorésistances différentes.

HIATT (1964), ZOTTOLA et MARTH (1966), KOKA et al. (1967) pensent par ailleurs que les deux phases trouvées dans l'inactivation d'un virus pourraient être dues à la dénaturation des protéines d'une part, des acides nucléiques d'autre part.

Cependant cette explication se heurte à une grande difficulté, soulignée par HIATT (1964) : la proportion des constituants les plus thermosensibles doit alors varier avec la température, puisque l'ordonnée du point de passage de la première à la seconde phase varie dans tous les cas avec ce facteur ; ce qui paraît peu vraisemblable.

b) Le corps dénaturé est homogène quant à sa sensibilité thermique, mais par contre deux mécanismes réactionnels différents interviennent successivement.

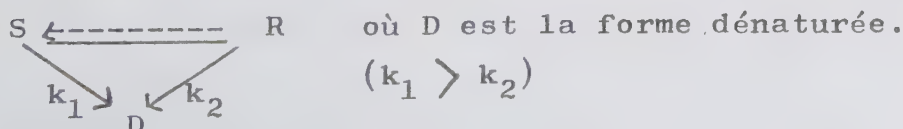
Ainsi LICCIARDELLO et al. (1967) expliquent les deux phases successives de premier ordre trouvées dans la dénaturation de la toxine botulinique (type E) par l'existence possible dans certaines molécules de pontages formés par des liaisons hydrogène, rendant ces molécules plus thermorésistantes que les autres.

Dans une intéressante théorie, WOESE (1960) suggère dans le cas de l'acide nucléique viral l'existence de deux formes en équilibre à chaque instant : $x \xrightleftharpoons[a+b]{c} A \xrightleftharpoons[b]{d} B \xrightarrow{b} x$, x étant la forme inactivée.

La forme A moins stable que la forme B, en raison de ponts hydrogène moins nombreux, serait inactivée par hydrolyse ou par destruction de sa structure secondaire, cependant que la forme B ne pourrait être détruite que par hydrolyse.

Quand $b > a$ il y aurait une phase unique et quand $a > b$, d étant négligeable, il apparaîtrait deux phases. Cependant cette théorie est contestée par HIATT (1960).

KOMEMUSHI et al. (1966) suggèrent dans un travail sur les spores bactériennes, la transformation sous l'effet de la chaleur de la spore à haute résistance thermique (S), en une spore à faible résistance (R) ; quand la proportion des spores R devient importante, il y a changement de la vitesse de dénaturation :



Il propose l'équation suivante :

$$N/N_0 = K_1 \exp (-k_1 + \lambda) \theta + K_2 \exp (-k_2 \theta)$$

avec $K_1 + K_2 = 1$

3°) Modifications possibles de la cinétique.

Il semble que, dans certains cas, en fonction des conditions du milieu réactionnel (concentration, température, teneur en eau, pH) la forme de la cinétique puisse varier.

Ainsi POLLARD (in DUCHESNE, 1964) montre, d'après les résultats de POWELL que l'invertase présente, à l'état sec, une dénaturation en une seule phase et, à l'état hydraté, une cinétique complexe qu'il analyse selon le raisonnement déjà indiqué.

GAJEWSKA et SHUGAR (1955, 1956) mettent en évidence de tels changements avec une solution de ribonucléase en faisant varier séparément le pH et la concentration de l'enzyme ; il sera montré ultérieurement qu'en ce qui concerne la concentration, ce résultat est erroné.

Enfin, WOESE (1960), avec des virus, GINOZA et ZIMM (1961) sur des pneumocoques, observent un tel changement de cinétique pour un certain seuil de température.

III - ROLE DE L'EAU DANS LA DENATURATION EN MILIEU SOLIDE.

Il apparaît que la teneur en eau joue un rôle considérable dans la dénaturation ; on en connaît les effets beaucoup plus que les mécanismes.

A. EFFETS QUALITATIFS ET QUANTITATIFS DE LA TENEUR EN EAU SUR LA DENATURATION DES PROTEINES.

1°) Effets observés sur des protéines simples.

Bien qu'il y ait relativement peu d'études sur ces sujets, la préoccupation qu'ils traduisent est ancienne : déjà LEWIS (1890) remarque que l'hydratation de l'albumine favorise la coagulation. Pour une durée de traitement thermique déterminée, il existe une corrélation négative entre l'H.R.E. et la température nécessaire pour obtenir un taux de dénaturation donné ; ce fait se dégage des observations de BARKER (1934) sur l'albumine, de GUARDIA et HAAS (1962) sur la lipase de germe de blé, de ROTHE (1967) sur la lipoxygénase, la lipase et la peroxydase du riz, de HUTCHINSON et BOOTH (1946) sur la phosphomonoestérase du blé. La durée (SISLER et JOHNSON, 1965) et la vitesse de dénaturation (ALBRECHT et al., 1966) varient également en fonction inverse de la teneur en eau de la protéine.

Cependant ALGIE et WATT (1962) montrent que la kératine est stabilisée par l'incorporation d'une faible quantité d'eau ; plus précisément HORNBROOK (1952) avec la sérum-albumine, GUY et al. (1967) avec les protéines du petit lait semblent déceler un maximum de résistance à la dénaturation en fonction de la teneur en eau, mais ils le situent dans des zones d'hydratation opposées.

Sur le plan thermodynamique BECKER et SALLANS (1956) dans le cas de la dénaturation des protéines du blé appréciée d'après le volume du pain obtenu, semblent trouver que l'énergie d'activation reste constante dans un domaine d'hydratation allant de 8 à 20 p.100, au-delà duquel elle subit une brusque variation ; ils montrent par contre que la constante de la relation d'ARRHENIUS augmente en fonction de la teneur en eau. Quoi qu'il en soit, ils concluent finalement que l'eau agit comme un catalyseur.

D'un autre côté, les énergies d'activation de la dénaturation de l'orthodiphénol-oxydase de la feuille de tabac, calculées par SISLER et JOHNSON (1965) passent par une valeur minimale en fonction de l'hydratation.

Par ailleurs, KOTLJAR et al. (1966) analysent l'effet de la teneur en eau sur la dénaturation thermique du blé, appréciée, parallèlement à la mesure du taux d'azote soluble, par le dosage des groupes sulfhydriles et des ponts disulfures. Il montre qu'à température égale, une augmentation de la teneur en eau a pour effet apparent de diminuer la quantité de SH libres et de ponts S-S.

2°) Effets observés sur un processus complexe d'altération biologique : la perte de viabilité des semences.

Les phénomènes de la vie exigent le bon fonctionnement d'un grand nombre de mécanismes assez délicats mettant en jeu de nombreuses substances biochimiques ; les protéines (et en particulier de très nombreux systèmes enzymatiques), les acides nucléiques, les hormones, les vitamines, sont sans doute parmi les plus importants.

Dans ces conditions, il n'est pas étonnant qu'un choc thermique, qui modifie les propriétés biologiques de ces substances, altère gravement les propriétés vitales et en particulier la viabilité des semences et des micro-organismes. ROSE (1967) a du reste traité des différents aspects de ces problèmes. Dans le cas de la viabilité des semences, qui nous intéresse ici particulièrement, il existe, même si les protéines ne sont pas les seules responsables, une corrélation entre leur dénaturation et la perte de viabilité, qui a été mise en évidence dans le cas du blé par HUTCHINSON (1944) et par HARRISON et al. (1969). L'eau joue, dans ces phénomènes biologiques, un rôle très important qui est la conséquence directe de son intervention au niveau des protéines.

De nombreuses études existent sur les effets du séchage des céréales ; mais le peu de données fournies (la durée est souvent non précisée) d'une part, la variation simultanée des deux facteurs, température et teneur en eau, d'autre part, font que ces études sont inexploitable du point de vue de l'analyse des lois de la dénaturation.

De la sorte, très peu de recherches sont relatives aux effets de l'eau sur la perte de viabilité. Il faut cependant souligner l'important travail de HUTCHINSON (1944) qui étudie l'influence de différents traitements thermiques effectués à hydratation constante, en fonction de la durée, sur le pouvoir germinatif du blé ; il résume ses résultats sous forme de deux courbes, respectivement pour 24 et 60 minutes de traitement, indiquant en fonction de la teneur en eau, l'une la température de début de diminution du pouvoir germinatif, l'autre la température correspondant à la perte totale de viabilité. Ces courbes sont exprimées par une équation, de la forme :

$$\theta = A - B \log t - C \log m$$

où θ est la température ; t , la durée ; m , la teneur en eau ; A , B et C , des constantes dépendant, en particulier, du niveau d'altération choisi.

Il existe donc une relation logarithmique entre la température et la teneur en eau nécessaire pour obtenir au bout d'un temps déterminé une perte de viabilité donnée. Toutes autres conditions constantes, la température est d'autant plus élevée que la teneur en eau est plus faible.

De plus, HUTCHINSON insiste sur le fait que la germination, quand elle se produit encore, est bien plus lente pour les grains traités.

Par ailleurs, plusieurs auteurs (ROBERTSON et al., 1939 ; TOUZART, 1958 ; KREYGER, 1959 ; LINKO, 1960 ; ROBERT, 1960 ; BURGESS et al., 1963 ; GUILBOT et POISSON, 1963) ont étudié la perte de viabilité des grains de céréales et de différentes graines au cours du stockage. Les lois observées, en fonction des mêmes critères température et hydratation, sont analogues à celles trouvées par HUTCHINSON dans le cas du traitement thermique, ce qui laisse à penser que des mécanismes d'altérations voisins peuvent intervenir.

B. ROLE DE L'EAU DANS LES MECANISMES DE DENATURATION.

Si les aspects descriptifs de la dénaturation en milieu solide ont été peu étudiés, le rôle de l'eau dans le mécanisme réactionnel l'a été encore moins ; il n'existe en effet sur ces sujets que des indications très fragmentaires.

Ce mécanisme est lié étroitement au rôle de l'eau dans l'organisation de la structure native, dont il a été discuté précédemment.

Comme le soulignent PRIVALOV et MREVLISCHUILI (1967), selon que l'on se réfère aux schémas de KAUZMANN ou de KLOTZ, le mécanisme de la dénaturation est différent. En partant du modèle de KLOTZ, en effet, la dénaturation apparaît comme la destruction, presque la fusion, des couches d'eau ordonnées autour de la macromolécule. Dans ce cas, la dénaturation serait suivie d'une diminution d'hydratation. Dans le modèle de KAUZMANN au contraire, la dénaturation doit s'accompagner d'une augmentation de l'hydratation.

BRANDTS (1967) propose un schéma de dénaturation un peu intermédiaire ; les groupements apolaires sont enfouis à l'intérieur de la molécule native qui offre au solvant ses groupements polaires ; après dénaturation, au contraire les groupements apolaires sont largement exposés au solvant, sans que la solvation des sites polaires soit sensiblement modifiée.

Par des mesures de calorimétrie, PRIVALOV et MREVLISCHUILI (1967) mettent effectivement en évidence une augmentation de l'hydratation ; cependant d'autres auteurs, toujours cités par PRIVALOV, trouvent, soit l'effet contraire, soit aucun effet. En particulier, on a pu montrer (BARKER, 1934 ; ALTMAN et BENSON, 1960) que l'affinité de l'eau pour la protéine, à une humidité relative donnée, est plus faible après dénaturation.

Quant au rôle proprement dit de l'eau dans le mécanisme de dénaturation, il comporte plusieurs aspects :

- d'une part, l'eau tend à augmenter la cohésion structurale de la molécule par les pontages qu'elle peut réaliser et par sa participation à la formation des liaisons hydrophobes. Dans ce cas, la fixation d'eau augmenterait la résistance à la dénaturation thermique (HORNIBROOK, 1952; ALGIE et WATT, 1962);
- d'autre part, l'eau peut avoir un effet contraire : celui d'un agent dénaturant, en raison même de son aptitude à former des liaisons hydrogène (JOLY, 1965). L'eau, en somme, pourrait rompre des liaisons hydrogène interchaînes pour se fixer sur les groupements ainsi libérés (FOSS et SCHELLMAN, 1959).

POLLARD (1964) a tenté une analyse mathématique du rôle de l'eau à partir des fonctions de partition et de l'énergie libre, en tenant compte des modifications dans la liberté rotationnelle des molécules d'eau. L'auteur conclut que l'eau intervient certainement pour une part en augmentant l'énergie libre de la molécule protéique hydratée, mise en jeu en nombre croissant, le nombre de molécules entraînées et gênées dans leur rotation par ce gonflement augmentant au fur et à mesure que la protéine gonfle.

CONCLUSION.

Plusieurs constatations peuvent être dégagées de la revue des travaux déjà effectués dans le domaine de la dénaturation des protéines.

La première, et la plus importante, c'est que très peu d'études systématiques ont été entreprises sur les protéines peu hydratées; que ce soit en milieu biologique complexe ou non, la plupart portent en effet sur les protéines pures en solution.

Les quelques données disponibles indiquent toutes que l'eau joue un rôle essentiel dans les mécanismes de dénaturation.

La deuxième est que l'on ignore si la protéine in situ, et la protéine pure ont, vis-à-vis du chauffage, un comportement analogue.

La troisième constatation est que, même en solution, les conclusions qui se dégagent des travaux expérimentaux ne sont pas toujours très claires ; les allures de la cinétique, les interprétations proposées, sont souvent contradictoires.

Seules, les observations sur les aspects thermodynamiques sont homogènes, mais on ignore dans quelle mesure elles sont extrapolables aux milieux solides.

Dans l'espoir de contribuer à éclaircir les nombreux points encore obscurs que présente le rôle de l'eau dans la dénaturation des protéines, nous avons orienté nos recherches dans les voies suivantes :

- étude des effets d'un choc thermique en faisant varier systématiquement l'un des facteurs (température, hydratation, durée) les deux autres étant maintenus constants, à la fois sur une protéine pure et bien connue telle que la ribonucléase pancréatique, et sur ce même enzyme, in situ, dans le blé;
- examen du comportement de la ribonucléase en solution au cours d'un chauffage, parallèlement à l'évolution de son activité ribonucléasique ;
- étude de la viabilité du blé, ce qui fait intervenir entre autre, des systèmes enzymatiques multiples.

Au cours de ces différents travaux, c'est donc l'évolution de l'activité enzymatique ou biologique qui a été considérée comme caractéristique de l'état de dénaturation des protéines et les résultats obtenus ont été analysés sur le plan cinétique et thermodynamique en tenant tout particulièrement compte de l'état de l'eau dans les systèmes examinés.

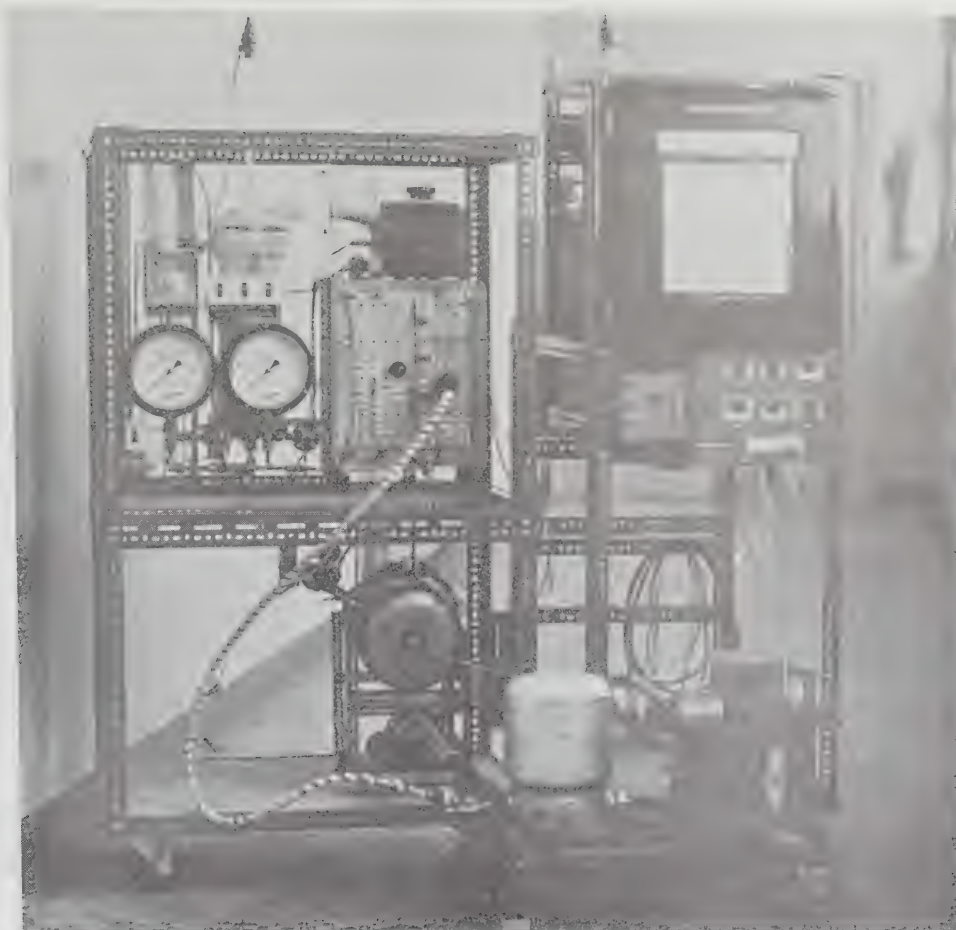


Figure 1 - Etuve à air conditionné destinée à l'étude des phénomènes de sorption, accompagnée (à droite sur la photo) de l'hygromètre électronique.



Figure 2 - Photographie de l'enceinte comportant le capteur de l'hygromètre électronique (a), et des enceintes pour choc thermique du blé (b) et de la RNase solide (c).

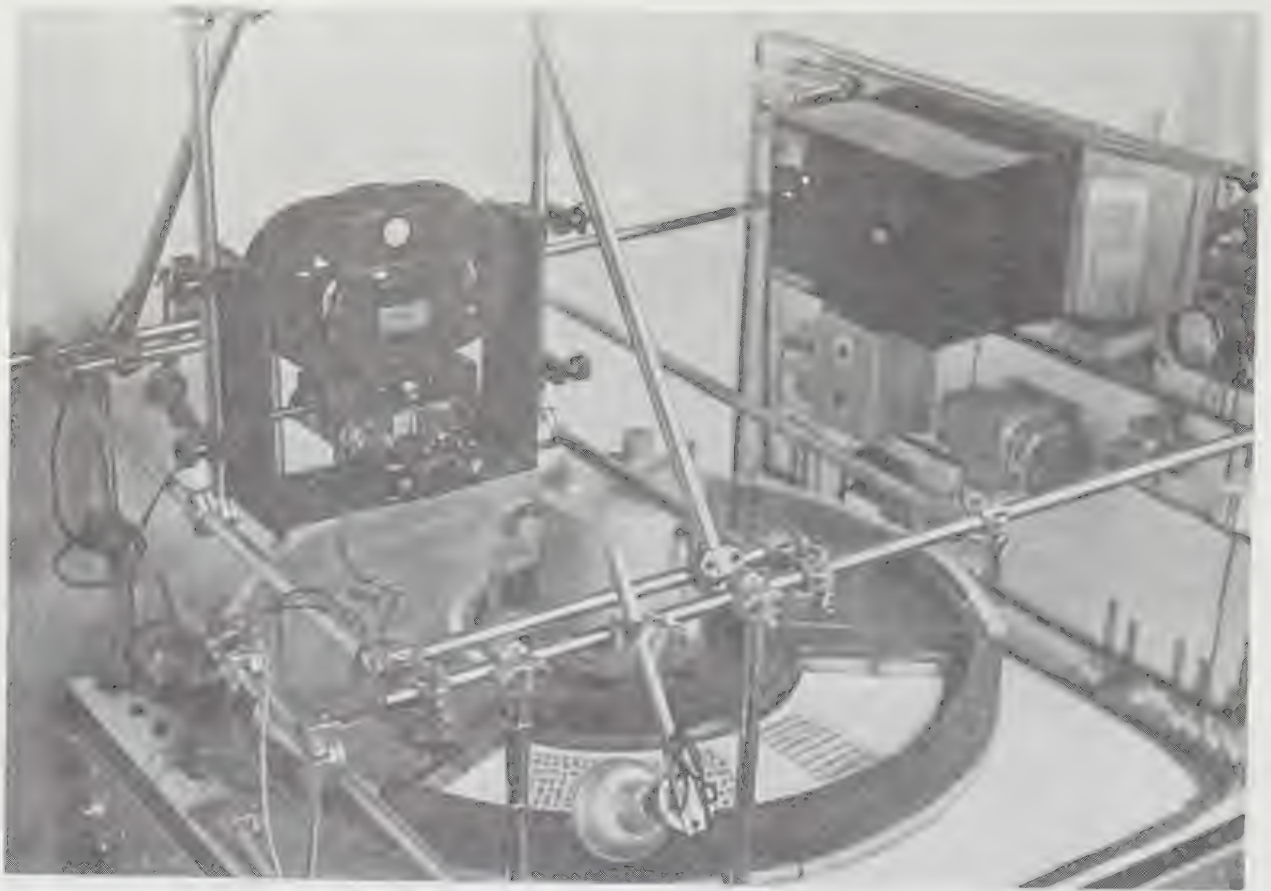


Figure 3 - Vue de l'appareil de germination, montrant en particulier le dispositif photographique et le plateau portant les germoirs.

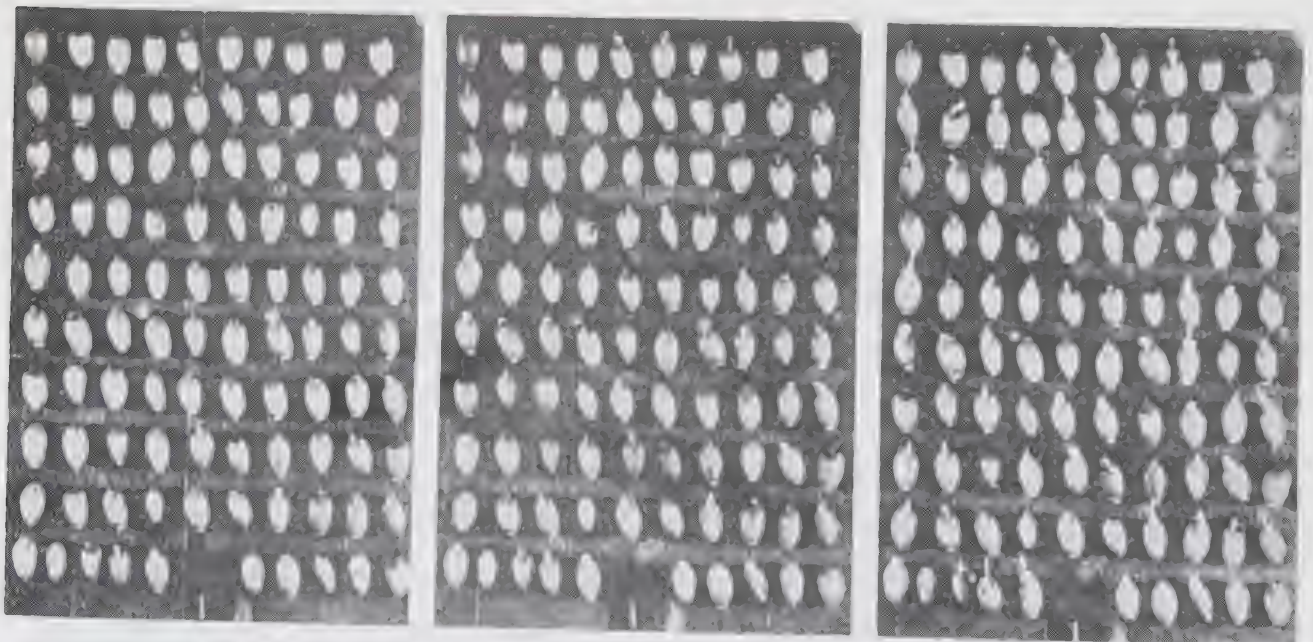


Figure 4 - Photos extraites d'un film de germination et correspondant à des durées égales respectivement au Temps moyen (b) et au T_m plus et moins deux fois l'écart type (a et c).

- CHAPITRE II - CONDITIONS EXPERIMENTALES -

I - MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

A. BLE.

Un lot de blé Cappelle, récolté en Août 1965, dans la région parisienne, a été nettoyé, puis, à l'aide d'un échantillonneur conique, homogénéisé et divisé par dicotomies successives en lots de 4 à 5 kg chacun ; ceux-ci ont été stockés dans des sacs en jute, à 16°/o de teneur en eau (par rapport à la matière sèche), et à 5°C, conditions considérées comme susceptibles de stabiliser au mieux les caractéristiques du grain de blé (MULTON et al., 1969).

Dans ces conditions, les caractéristiques technologiques habituelles, qui étaient excellentes au départ, se sont parfaitement maintenues pendant toute la durée des essais ; l'alvéogramme, la flore, le pouvoir germinatif en particulier sont demeurés stables. L'activité ribonucléasique est demeurée égale à 0,555, valeur exprimée en densité optique, dans les conditions du dosage utilisé.

Le temps moyen de germination du blé témoin a sensiblement augmenté pendant la durée des essais; ceci est dû à la grande sensibilité de cette mesure au plus léger début d'altération se produisant au cours du stockage, même effectué dans les meilleures conditions.

B. PREPARATIONS DE RIBONUCLEASE ET D'ACIDE RIBONUCLEIQUE.

Les préparations cryodesséchées de ribonucléase pancréatique et d'acide ribonucléique ont été conservées à -20°C.

Deux types de ribonucléase ont été utilisés ; l'une (type III) est chromatographiquement pure, débarrassée des protéases, des sels et du composant inactif présent dans la ribonucléase cristallisée ; l'autre chromatographiquement homogène, correspond à la fraction D de TABORSKY (1959). L'ARN est extrait de la levure, selon ALLEN (1955).

II - METHODES UTILISEES ET MISES AU POINT

A. DOSAGE DE L'EAU

Différentes méthodes de dosage de l'eau ont été utilisées au cours de ce travail :

- une méthode de référence consistant en un séchage à 50°C, sous vide, en présence de P_2O_5 jusqu'à masse constante (GUILBOT, 1964) ;
- des méthodes pratiques ou rapides : étuvage à 130°C pendant 2 h, méthode à l'étuve rapide à 200°C (1), méthode électrique (GUILBOT, 1968)

B. MESURES D'HUMIDITE RELATIVE DE L'AIR

Les mesures d'humidité relative ont été effectuées :

- soit avec un hygromètre électronique à point de rosée (2) accouplé à un potentiomètre (3). Cet équipement permet d'enregistrer en continu la température de rosée d'un échantillon d'air prélevé dans l'enceinte, ainsi que les températures sèches en divers points de celle-ci, à l'aide de thermo-couples cuivre-constantan ;
- soit avec un hygromètre à capteur électronique (4) ; cet appareil comporte une sonde de très petite dimension constituée d'un film hygroscopique dont les propriétés électriques varient avec la teneur en eau. Ce film introduit dans un pont de mesure, permet, après étalonnage du système, une lecture directe en humidité relative, avec compensation automatique de la température.

C. DETERMINATION DE L'AFFINITE POUR L'EAU (SORPTION) DES PRODUITS ETUDI

Deux types de méthodes ont été utilisées au cours de cette étude :

1. Première méthode

Cette méthode gravimétrique (DRAPRON et GUILBOT, 1962) consiste à déterminer la variation de masse de la prise d'essai placée dans une atmosphère à température constante et à H.R. conditionnée à l'aide de solutions d'acide sulfurique, sous un vide partiel destiné à accélérer la diffusion de la vapeur d'eau entre la solution et la substance.

2. Deuxième méthode

Une méthode gravimétrique plus rapide a été mise au point permettant d'étudier simultanément plusieurs échantillons (MULTON et al., 1967). Elle consiste à disposer les échantillons dans une étuve multicellulaire (fig. 1) de grande stabilité thermique qui comporte un dispositif

(1) CHOPIN . (2) Compagnie des Compteurs, type HCPI E1 AD 50 . (3) MECI .
(4) SINA (VIBROMETER).

assurant la circulation de l'air conditionné. La régulation de l'humidité relative (fig. 5) est assurée automatiquement par saturation en vapeur d'eau de l'air comprimé sous une pression total $H + \pi$ (H étant la pression atmosphérique, π la surpression lue sur le manomètre) suivie d'une détente isothermique jusqu'à la pression atmosphérique. Dans ces conditions, on montre que l'H.R. est égale au rapport $\frac{H}{H + \pi}$; le réglage de l'H.R., très simple, consiste à amener la pression $H + \pi$ à la valeur convenablement choisie.

Il existe un bon accord entre le calcul d'erreur théorique et l'analyse expérimentale de la reproductibilité tant des H.R. mesurées à l'hygromètre, que des teneurs en eau ; à titre d'exemple, le tableau 2 donne les coefficients de variation de ces deux mesures.

Tableau 2 - Coefficients de variation (rapport de l'écart-type à la moyenne, exprimé en p.100) en fonction de l'H.R., relatifs aux résultats obtenus dans l'étuve de sorption à air conditionné.

H.R. prévue		20	30	40	50	60	70	80	90	95
coefficient de variation p.100	H.R.	2,7	2,55	1,94	2,1	1,9	2,36	2,08	1,33	0,46
	teneur en eau	4,7	3,03	2,25	1,54	0,69	0,87	1,09	3,85	2,08

On a par ailleurs constaté que, au moins dans le cas de l'amidon, les écarts observés entre les valeurs obtenues par cette méthode et par la précédente, sont du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales, au moins dans le domaine étudié.

D. DOSAGE DU TAUX DE PROTEINES.

Il a été effectué par la mesure directe de l'absorption ultra-violette des solutions à 280 nm, en se référant à une courbe étalon (WARBURG, 1948 ; JAVILLIER et POLONOWSKI, 1963). Bien qu'approximatif, ce dosage reposant sur l'absorption des résidus d'acides aminés aromatiques dans l'U.V., s'est révélé suffisant pour les essais effectués.

E. DOSAGE DES GROUPES SULFHYDRILES ET DES PONTS DISULFURES.

La méthode mise au point par BENESCH (1952), STRICKS et al. (1954) et GODON et al. (1966) a été appliquée. Dans une première étape, les groupements SH libres ou ceux résultant de la rupture des ponts disulfures, par action du sulfite, sont dosés par réaction avec des ions éthylmercuriques dont on détermine la quantité en excès par titration ampérométrique.

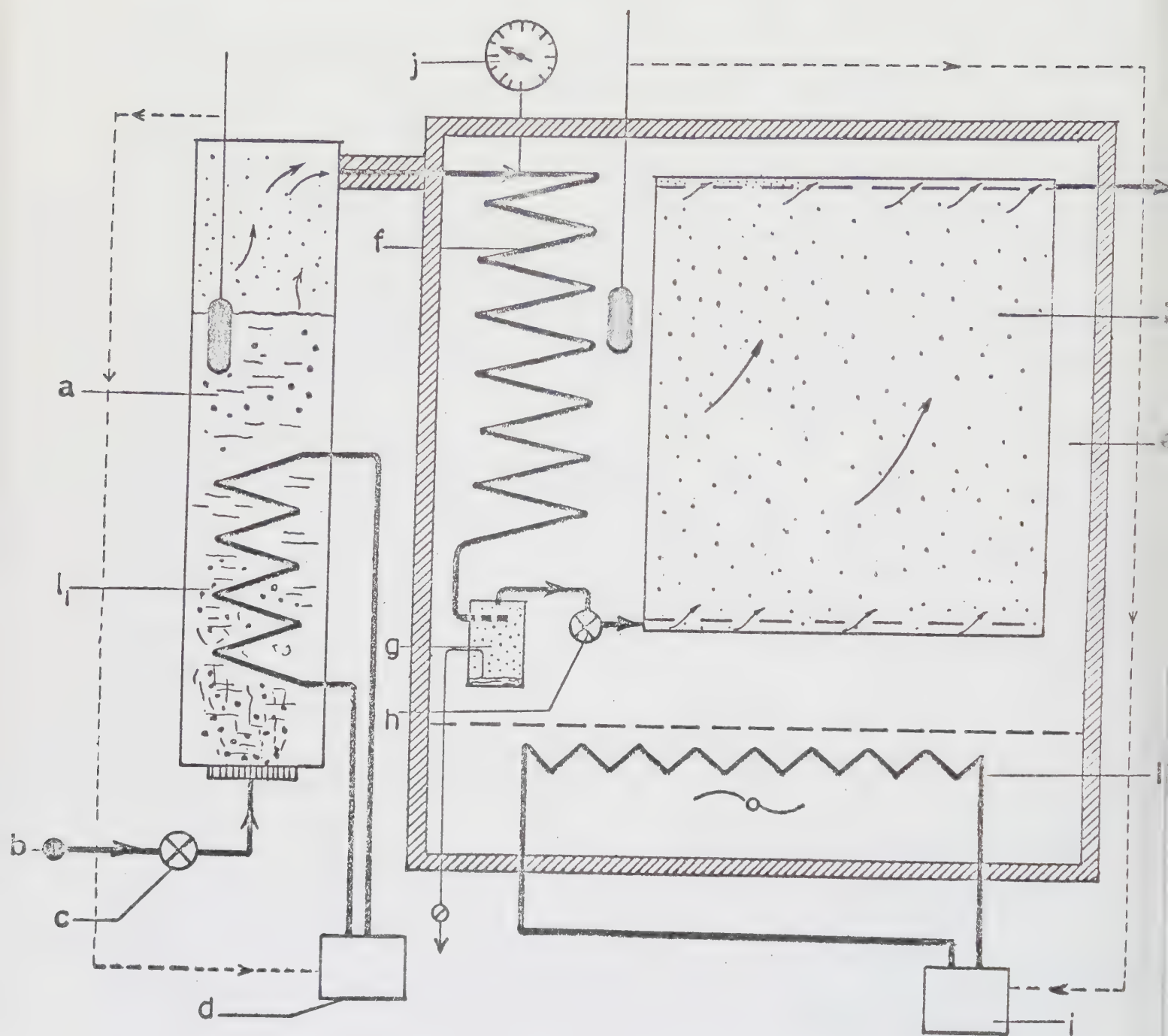


Figure 5 - Schéma montrant le dispositif de conditionnement d'air de l'étuve à sorption. (a, saturateur ; b, arrivée air comprimé ; c, premier détendeur ; d et i, relais de commande ; e, enceinte thermostatée ; f, condenseur ; g, fiole de récupération ; h, deuxième détendeur ; l₁ et l₂, résistances de chauffage ; j, manomètre ; k, enceinte conditionnée).

Dans une deuxième étape, seuls les groupements sulfhydriles libres sont dosés. La différence entre les deux mesures permet d'apprécier la proportion de ponts S-S. On opère en milieu d'urée 8 M afin de rendre par dénaturation tous les groupes accessibles au sulfite et au réactif organo-métallique ; enfin, pour éviter tout risque d'oxydation, la réaction est effectuée en atmosphère d'azote.

F. DOSAGE DE L'ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE GLOBALE EXTRACTIBLE DU BLE

Cette détermination est basée sur le dosage spectrophotométrique des oligonucléotides acido-solubles après extraction et purification de la préparation enzymatique.

La méthode mise au point devait être précise, mais cependant suffisamment simple pour permettre le dosage en série, sans matériel trop complexe. Elle comporte deux phases :

- a) L'extraction est effectuée, après broyage du blé en présence de carboglace, en milieu de force ionique 0,5 , pendant 1 heure à 5°C. Après centrifugation, le surnageant est purifié par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium ; le culot de la dernière centrifugation repris dans 100 cm³ de bicarbonate d'ammonium constitue l'extrait enzymatique. Cet extrait est débarrassé de la plupart des protéines : l'activité spécifique est augmentée de 3500 p.100, mais on ne peut exclure la présence de phosphodiesterases non spécifiques. Par conséquent il est prudent de parler du dosage de l'ensemble des activités ribonucléasiques du blé, plutôt que de celle de la ribonucléase.
- b) Le dosage de l'activité RNasique de l'extrait est effectué en faisant agir celui-ci sur une solution d'ARN à 1 p.100, à 37°C et à pH 5, pendant 20 minutes. La réaction est stoppée par adjonction d'acétate d'uranyle en solution dans l'acide perchlorique, ce qui précipite l'ARN non hydrolysé ; après centrifugation, les oligonucléotides acido-solubles du surnageant dilué 15 fois sont dosés par spectrophotométrie UV, à 260 nm .

Une étude critique de cette méthode a été faite, permettant de définir les conditions optimales du dosage. L'analyse expérimentale de la reproductibilité a permis de montrer que celle-ci est satisfaisante, avec des coefficients de variation de 2,54 p.100 et 3,08 p.100 respectivement dans le cas de dosages faits sur un même extrait, et de dosages effectués à partir d'extraits différents.

L'étude détaillée de cette méthode est présentée par ailleurs, (MULTON, 1969).

G. DOSAGE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

La technique utilisée est celle préconisée par l'A.A.C.C. (méthode 22-60), (1962). Schématiquement, cette méthode consiste à doser la quantité d'azote soluble libérée par l'action de l'extract enzymatique dans des conditions standardisées sur de la bacto-hémoglobine.

H. DOSAGE DE L'ACTIVITE AMYLASIQUE

La méthode utilisée est celle dite de détermination du temps de chute de HAGBERG (1960) : l'activité amylasique est appréciée par le temps mis par une charge constante à parcourir une distance donnée dans une suspension de farine empesée et soumise à l'action de ses amylases.

I. DETERMINATION DU TEMPS MOYEN DE GERMINATION

La méthode utilisée pour cette étude (MULTON et al., 1967, 1968) consiste à suivre l'évolution du nombre de grains germés en fonction du temps de germination. Pour cela, un appareil automatique d'enregistrement photographique (fig.3.) a été mis au point : il permet de suivre simultanément jusqu'à 15 échantillons de 100 grains en les photographiant chacun une fois par heure pendant des durées pouvant atteindre 1 à 2 semaines. Les grains sont disposés sur des germoirs comportant un système d'alimentation automatique de l'eau, réglable en intensité grâce à un dispositif basé à la fois sur le vase de Mariotte et sur le phénomène de succion capillaire du papier recouvrant le germoir. L'ensemble de l'appareil est placé dans une enceinte isotherme.

La lecture des films obtenus (fig.4.) permet de compter le nombre de grains germés en fonction du temps écoulé à partir de l'instant où les grains sont placés dans les germoirs ; on établit ensuite la distribution cumulée des durées de germination, dont on calcule l'effectif, la moyenne (temps moyen de germination - T_m), et la variance (fig. 6.). On considère comme germé tout grain dont la radicule a percé les enveloppes et s'est allongée de façon décelable sur la photo. Cette définition a été retenue pour des raisons pratiques, même si physiologiquement elle ne correspond pas à une réalité précise ainsi que le souligne EVENARI (1957).

L'expression analytique du temps moyen de germination est la même que celle de l'inverse du "coefficient de vitesse" de KOTOWSKI (1926), utilisé également par HARRINGTON (1962), COME (1967) et DURAND (1953) ; mais, outre la notion de vitesse de germination, le T_m introduit la notion de distribution statistique qui rend son exploitation plus fructueuse.

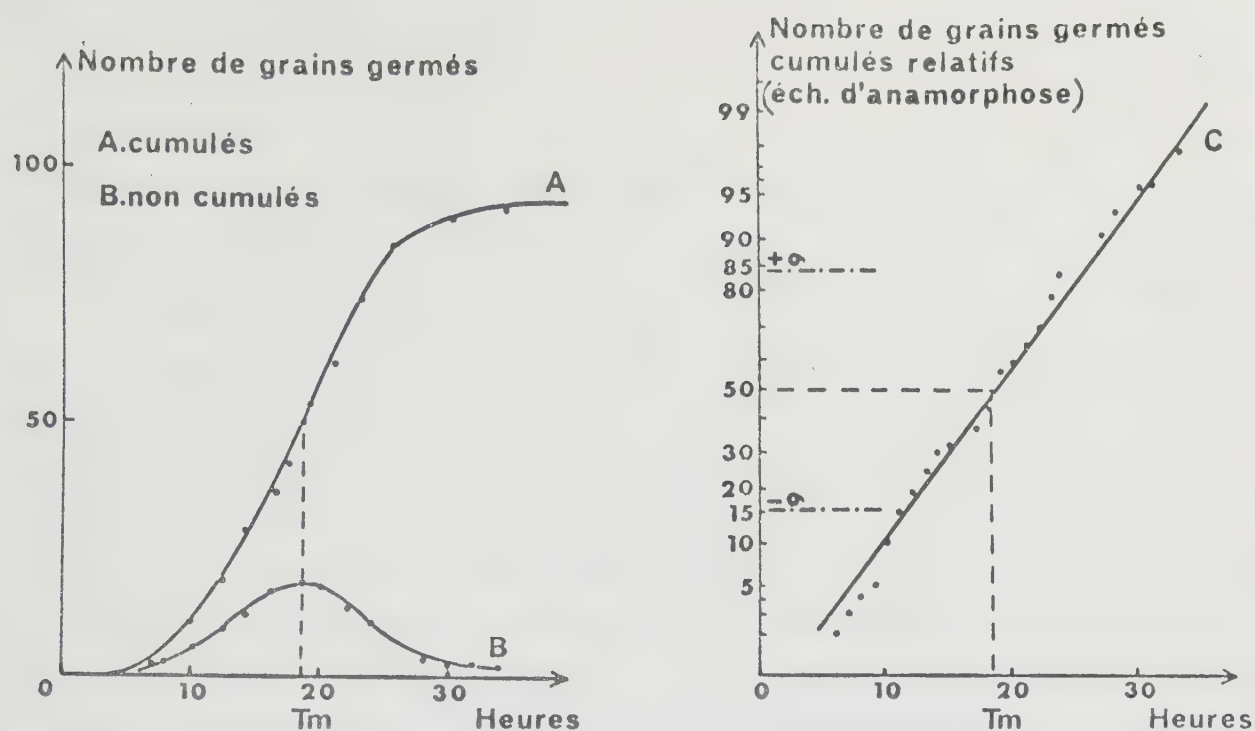


Figure 6 - Représentation de la distribution des durées de germination pour un échantillon de 100 grains. A - distribution cumulée ; B - distribution non cumulée (courbe de Gauss) ; C - représentation sur une échelle de probabilité.

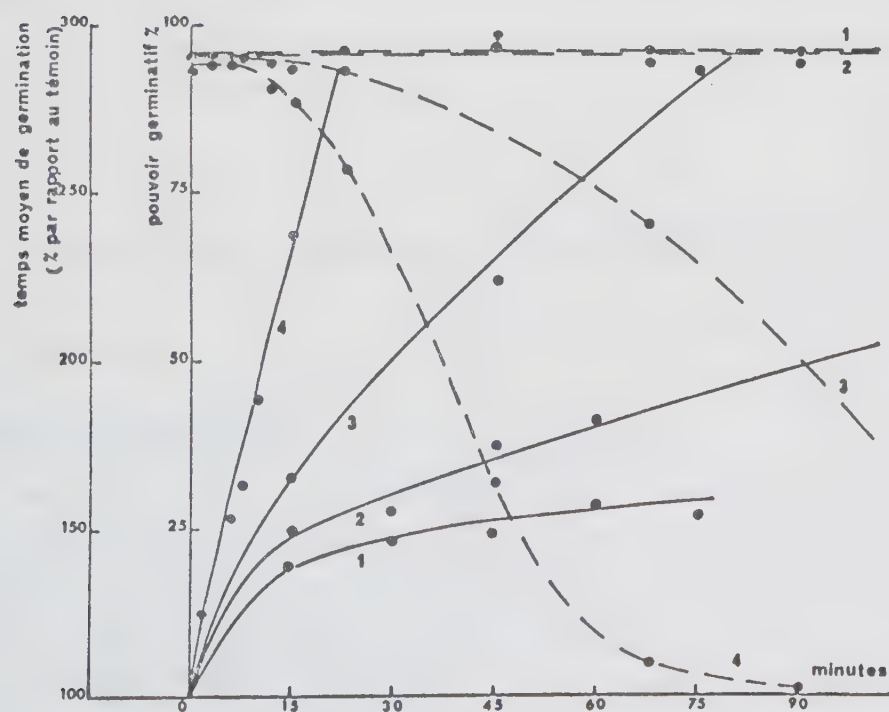


Figure 7 - Evolution comparée de l'énergie germinative (courbes tiretées) et du temps moyen (courbes continues), en fonction de la durée d'un choc thermique effectué sur du blé humide (35% S.S.), pour les températures de 50°C (1), 54°C (2), 56°C (3) et 58°C (4).

Les autres expressions possibles de la vitesse de germination, rappelés dans COME (1968), n'ayant pas donné de résultats meilleurs, n'ont pas été utilisées.

Il faut tout d'abord noter que le temps moyen de germination mesuré est relatif à la population des grains vivants, ayant germé, les grains morts étant éliminés, ou plus exactement formant une sous-population à part ; de ce fait, l'effectif de l'échantillon sur lequel on mesure le T_m est égal au pouvoir germinatif du lot (p.g.).

La mesure du T_m n'a vraiment de sens et d'intérêt que pour autant que le p.g. soit suffisamment élevé (supérieur à 70 p.100) ; en-dessous de ce taux, d'une part, la diminution de l'effectif réduit l'intervalle de confiance de la mesure, et, d'autre part, l'altération du grain est assez prononcée pour que le p.g. en rende bien compte.

Par contre, pour les grains conservant un fort p.g., la mesure du T_m présente un intérêt particulier ; en effet, statistiquement parlant, une moyenne est un critère beaucoup plus sûr et plus précis qu'un simple pourcentage.

Une étude critique de la méthode, envisageant l'influence des principaux facteurs d'erreurs, a montré que pour un lecteur donné, le coefficient de variation est de l'ordre de 3 p.100.

Il s'est avéré que cette méthode, utilisée pour apprécier la viabilité du grain, est beaucoup plus sensible que les méthodes classiques de mesure du pouvoir germinatif et de l'énergie germinative, ainsi que le montre la figure 7. Par ailleurs, on a montré que dans la plupart des cas, la distribution des temps de germination est sensiblement gaussienne.

III - DESCRIPTION ET ETUDE CRITIQUE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A. DESCRIPTION DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1 - Dans le cas du blé

a) Conditionnement de l'échantillon

Le blé, criblé pour éliminer les éléments de tailles extrêmes, est humidifié ou séché afin de l'amener à la teneur en eau voulue pour l'essai. L'humidification est faite par adjonction directe d'eau liquide, puis agitation lente pendant 5 jours au moins, à 0°C ; on obtient ainsi une homogénéité suffisante de la répartition de l'eau.

Le séchage est effectué dans un appareil construit au laboratoire (fig. 8) ; il est constitué d'une double enceinte fermée, dans laquelle l'air est aspiré à travers le ou les lots de grains, puis soufflé sur une solution saline saturée qui le déshydrate, avant qu'il ne revienne au contact des grains. L'évolution du séchage est suivie par des pesées périodiques.

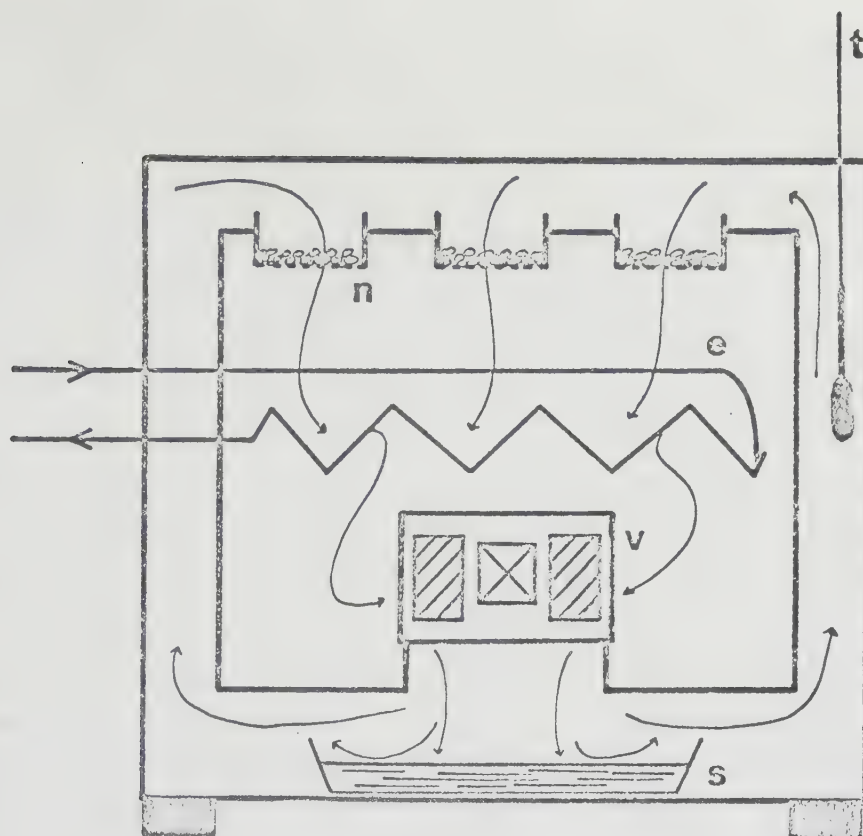


Figure 8 - Schéma montrant le principe de l'appareil utilisé pour le séchage
séché des lots de blé. (v, ventilateur ; n, nacelle contenant les échantillons
de blé ; s, solution déshydratante ; e, échangeur thermique à circulation d'eau
chaude ; t, thermostat de commande de l'échangeur).

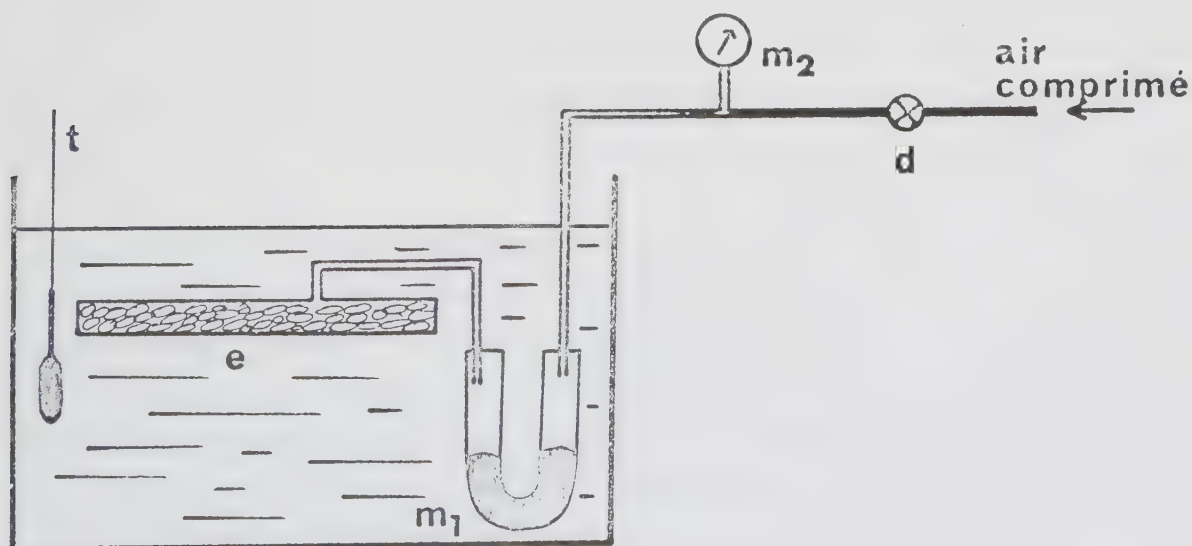


Figure 9 - Schéma du dispositif différentiel utilisé pour la mesure de la pression
développée dans l'enceinte étanche au cours du choc thermique.

Les échantillons ayant des teneurs en eau très éloignées de l'équilibre avec l'atmosphère ambiante sont ensuite manipulés, selon les cas, soit en chambre froide, soit dans une boîte à gants à air conditionné. Le dispositif de conditionnement est analogue à celui décrit dans la méthode de sorption n°2, sauf lorsqu'on désire de l'air déshydraté ; on utilise dans ce cas une circulation d'air forcée dans des flacons barboteurs contenant de l'acide sulfurique concentré.

b) Réalisation du choc thermique

Chaque échantillon de grains subit alors le choc thermique pendant une durée et à une température déterminées. Celui-ci est effectué à teneur en eau constante en plongeant dans un bain d'eau, ou d'huile réglé par thermostat, des récipients étanches contenant le grain. Deux techniques ont été utilisées, qui toutes les deux permettent de disposer les grains en couche unique afin de rendre le transfert de chaleur aussi rapide que possible. Le premier dispositif consiste en des sachets d'aluminium-polyéthylène soudés sous vide ; les difficultés pratiques ont conduit à utiliser des plaques circulaires de Dural séparées par un joint torique laissant l'épaisseur nécessaire aux grains et boulonnées sur la périphérie (fig. 2).

Après refroidissement, les échantillons sont, s'il y a lieu, séchés ou humidifiés jusqu'à une teneur en eau finale de 14 p.100 s.s., prise comme valeur standard. L'échantillon témoin ne subit pas de choc thermique mais se trouve soumis aux mêmes conditionnements que les échantillons traités.

Pour les hydratations élevées, les essais concernant les deux tests (activité RNase, Temps moyen de germination) sont effectués sur les mêmes échantillons, qui, après le choc thermique sont alors divisés en deux parties aliquotes : l'une est mise en germination, l'autre est broyée en vue de l'extraction.

En dessous d'une teneur en eau de 30 p.100, il faut dissocier les deux expériences, les zones de températures dénaturantes n'étant plus les mêmes. Le choix initial des températures pour chaque teneur en eau n'a pas été arbitraire ; nous avons pris en considération les résultats des travaux de HUTCHINSON (1944) sur l'évolution du pouvoir germinatif du blé en fonction de chocs thermiques variés, et de BOOTH (1948) sur la sensibilité thermique de l'extrait de RNase de blé.

L'ensemble de ce protocole expérimental, dans le cas du blé, est résumé sur l'organigramme présenté sur le tableau 3.

Ainsi au cours d'un mois de travail, il est possible de mesurer l'activité RNasique résiduelle et le Tm de 12 échantillons (11 échantillons traités et un témoin). Ultérieurement, l'utilisation de

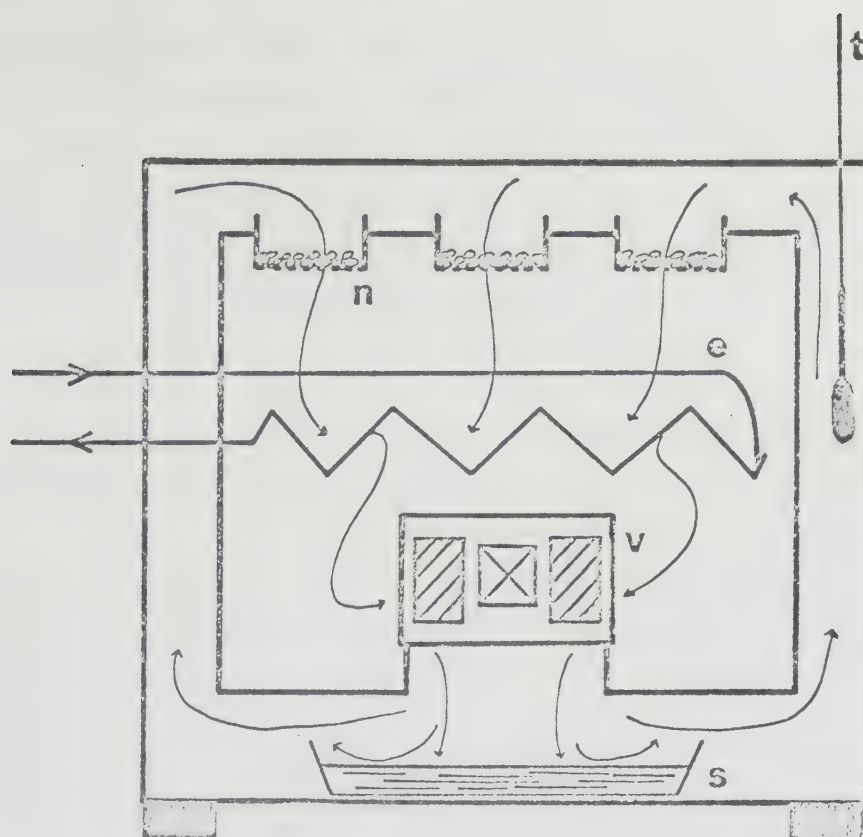


Figure 8 - Schéma montrant le principe de l'appareil utilisé pour le séchage par lots de blé. (v, ventilateur ; n, nacelle contenant les échantillons de blé ; s, solution déshydratante ; e, échangeur thermique à circulation d'eau chaude ; t, thermostat de commande de l'échangeur).

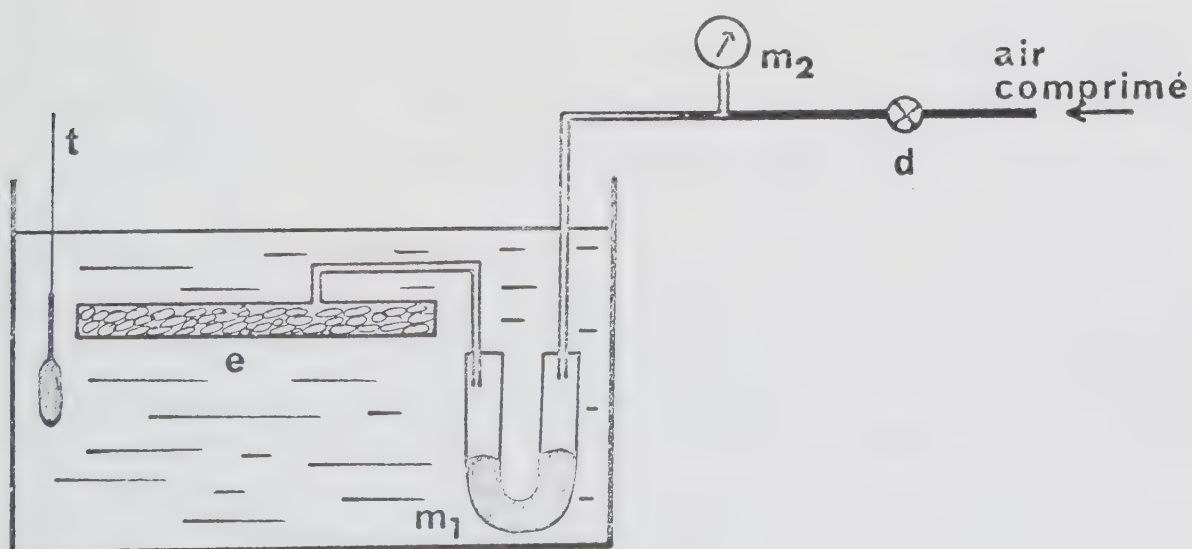


Figure 9 - Schéma du dispositif différentiel utilisé pour la mesure de la pression développée dans l'enceinte étanche au cours du choc thermique.

nouveaux pots de centrifugation a permis de doubler la capacité de dosage de la RNase extractible après choc thermique (24 échantillons par mois) : cependant, la germination demeure un facteur limitant. La durée de ces essais explique qu'il ait fallu réduire leur nombre, surtout si l'on tient compte de ceux qui, défectueux, devaient être recommencés. Cependant, l'expérience de choc thermique sur le blé comporte environ 180 chocs et dosages différents.

2 - Dans le cas de la RNase pancréatique

a) La RNase en solution est chauffée dans un petit autoclave (12 cm^3), en acier inox, rempli de la solution préalablement amenée à une concentration déterminée. Après le choc, le dosage de l'activité est effectué directement sur une partie aliquote.

b) La RNase pancréatique "solide" est disposée à raison de 1,5 mg environ dans des récipients en acier inox spécialement conçus et usinés à cet effet (fig. 2.). Ces récipients sont alors placés dans l'étuve Chopin à air conditionné pendant une journée et demie afin d'amener la teneur en eau de la ribonucléase à une valeur déterminée. Cette teneur en eau ne peut être dosée, en raison de la très faible quantité de substance : elle n'est connue qu'indirectement par référence à la courbe de sorption préalablement établie (cf. Chap. III), et par mesure de l'H.R. de l'enceinte. Après fermeture des récipients, la ribonucléase est soumise au choc thermique. Après refroidissement, les récipients sont ouverts, puis placés dans une enceinte à H.R. $\approx 50 \text{ p. } 100$ afin de la ramener à une teneur en eau voisine de l'équilibre avec l'atmosphère du laboratoire. On pèse alors aussi exactement que possible 1 mg de RNase que l'on dissout dans 200 cm^3 (concentration $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) d'eau pure ; on prélève 1 cm^3 de cette solution pour effectuer le dosage d'activité. L'échantillon témoin subit les mêmes conditionnements que ceux traités.

B. ETUDE CRITIQUE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1 - Etude physique du choc thermique

a) Vérification de la constance de la teneur en eau au cours du choc thermique

Le but poursuivi est de réaliser un choc thermique sur le blé à teneur en eau constante. Il est facile de montrer par le calcul que ceci est réalisable, si le récipient est étanche. Celui-ci a un volume de 50 cm^3 environ, dont la moitié approximativement est occupée par du blé, l'autre moitié par de l'air ; le blé étant à 16 p.100 de teneur en eau et à 25°C , l'H.R.E. et la pression de vapeur d'eau (p_1) correspondantes sont respectivement de 60 p.100 et de 14,4 mm Hg.

Le récipient contenant 40 g de grains (dont 5,6 g d'eau) est porté, par exemple à 130°C ; en supposant que, dans ces conditions, la nouvelle H.R.E. s'établisse à 100 p.100, par désorption du blé, la pression de vapeur d'eau est alors de 2,86 kg/cm² ; l'augmentation de pression de vapeur d'eau est : $2,86 - p_1 \neq 2,86$ kg/cm², en négligeant p_1 . Dans ces conditions, le nombre de molécules d'eau qui désorbent est donné par l'équation d'état $p v = n R T$, en supposant les gaz parfaits :

$$n = \frac{25 \cdot 10^{-3} \cdot 2,86}{0,082057 \cdot 403} = 0,00225 \text{ mole d'eau (R = 0,082057 l/atm} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{°K)}$$

soit 0,0405 g d'eau. Par rapport aux 5,6 g d'eau contenus par les grains, il y a donc moins de 1 p.100 qui désorbe, soit moins de 0,1 p.100 par rapport au blé. Cette quantité peut être tenue pour négligeable.

En réalité, la quantité d'eau qui désorbe est bien plus faible que celle-ci, l'H.R.E. étant inférieure à la valeur de 100 p.100 utilisée pour le calcul, comme il sera montré au paragraphe suivant. Des dosages d'eau effectués après l'ouverture des enceintes confirment leur étanchéité en montrant une perte négligeable, de l'ordre de 0,1 p.100 en valeur absolue (tableau 4). Cette faible quantité d'eau est peut être perdue au cours du refroidissement, à moins qu'elle n'ait participé à des réactions chimiques ou enzymatiques au cours du chauffage.

Tableau 4 - Teneurs en eau des grains placés dans l'enceinte étanche, avant et après le choc thermique.

Teneur en eau du grain à la fermeture °/°	13,89	13,95	22,23	30,22	30,29	35,24	35,52	35,75
Teneur en eau à l'ouverture (moyenne de 10 plaques) °/°	13,83	13,93	22,08	30,20	29,98	35,04	35,37	35,68
Différence	-0,06	-0,02	-0,15	-0,02	-0,31	-0,20	-0,15	-0,07

b) Etude à l'aide de l'hygromètre Sina de la variation de l'H.R.E. au cours du traitement thermique.

Une enceinte pour choc thermique a été spécialement réalisée, afin de pouvoir y loger la sonde sensible de l'hygromètre Sina (fig. 2).

En plaçant cette sonde dans un caisson étanche, en présence d'une solution saturée de NaCl, il a été vérifié au préalable que la réponse de l'appareil n'est pas affectée par une pression ambiante allant jusqu'à 3 kg/cm² au plus.

L'enceinte étant remplie de blé à une teneur en eau donnée, il est vérifié que l'équilibre d'H.R. indiqué par l'appareil correspond à celui lu sur la courbe de sorption pour la même température. Quand on plonge le récipient dans le bain à température élevée, l'enregistrement d'H.R. montre un tracé caractéristique (fig.10) que l'on peut analyser de la façon suivante :

- parfois, une augmentation apparente de l'H.R. (1), de courte durée, est sans doute due à l'équilibre thermique de la sonde ;
- la diminution très rapide de l'H.R. (2), qui se produit ensuite, est due à l'augmentation de la température de l'air du récipient ;
- simultanément le blé désorbe de l'eau, et quand ce phénomène prend le pas sur le précédent, l'H.R. remonte (3), assez lentement cependant ;
- enfin, un état d'équilibre s'établit de nouveau (4) pour une certaine valeur de l'H.R.E.

Les enregistrements de l'hygromètre permettent de plus d'apprécier les durées de ces différents phénomènes. Les valeurs suivantes peuvent être déterminées :

- . la durée t_1 correspond au minimum d'H.R. atteint ;
- . la durée t_2 , correspond au point où les 95 % de la valeur finale d'équilibre de l'H.R. sont atteints.

Un certain nombre d'entre elles sont consignées dans le tableau 5., en fonction de la teneur en eau du grain et de la température du choc.

Tableau 5. - Résumé des mesures effectuées avec l'hygromètre SINA au cours de chocs thermiques sur le blé

Teneur en eau % s.s.	H.R.E. correspon- dante à 25°C	Température du choc thermique	t_1 min.	t_2 min.	H.R.E. mesurée à la température du choc	H.R.E. calculée sur courbes de désorption
16	64	50 90	3 2	20 16	64 63,5	80 > 95
21	84	40 60 70 80	2 1,5 1,5 1,2	14 14 11 10	81 79 78 78	80 95 > 95 > 95
28	95	50 60 75	2,5 3 2	14 12 13	89 87 86	> 95 > 95 > 95
31	98-99	60	2,5	14-15	91	> 95
31 avec fuite	98-99	60	2,5	15-16	90	> 95

On observe en particulier que la nouvelle valeur d'H.R.E. atteinte est très nettement inférieure à celle que permet de prévoir l'extra-

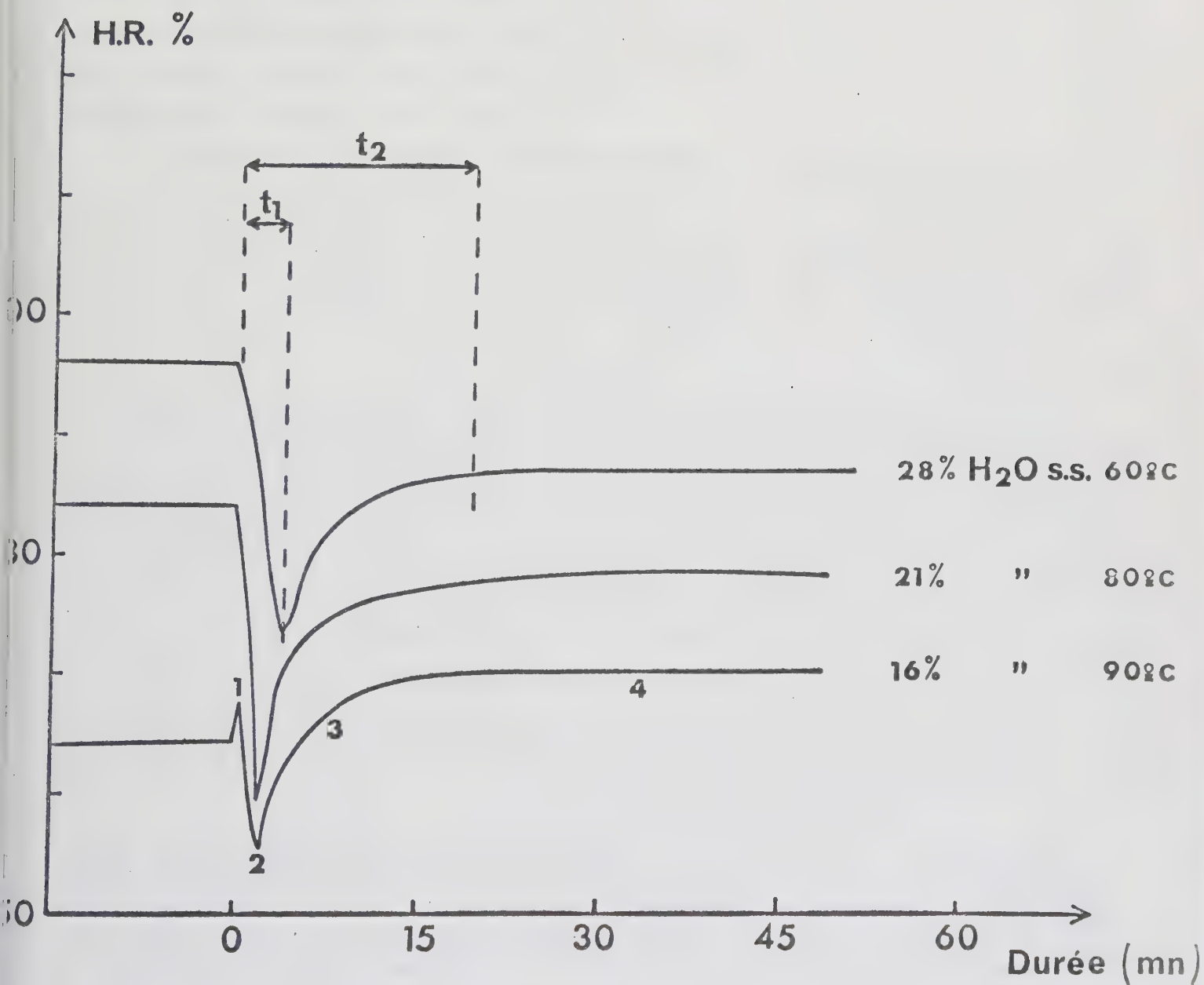


Figure 10 - Evolution en fonction du temps de l'H.R.E. du blé dans l'enceinte anchaue au cours d'un choc thermique, pour diverses températures et teneurs en u.

polation de la courbe de sorption à la température considérée. Il semble, et les mesures de pression relatées au paragraphe suivant le confirmeront, que tout se passe comme s'il y avait "refus de désorption" lors du chauffage. Afin de voir si cet effet n'est pas dû à la pression qui se développe dans la plaque, un essai spécial a été conduit, avec du blé à 31 p.100 de teneur en eau, dans une enceinte comportant un ajustage très fin qui émerge du bain; ce dispositif permet de maintenir dans l'enceinte la pression atmosphérique pendant toute la durée du choc thermique, tout en limitant au maximum les échanges gazeux; le dosage d'eau effectué sur le grain montre qu'il n'y a ainsi aucune perte d'eau notable: le grain venant de l'enceinte étanche a une teneur en eau de 31,92 p.100, celui venant de l'enceinte avec ajustage, 31,78 p.100, la différence n'est pas significative.

Les résultats, en ce qui concerne les valeurs mesurées sur l'enregistrement de l'hygromètre SINA (tableau 5.), ne sont pas significativement différents de ceux obtenus dans l'enceinte habituelle où la pression se développe normalement au cours du choc; la pression ne semble donc pas devoir être mise en cause.

Cette observation est à rapprocher de celle faite au laboratoire par GUILBOT, (1968 et 1969); il est en effet apparu, à plusieurs reprises, que les isothermes de sorption ou de désorption se croisent, et que dans les hautes humidités relatives, la courbe correspondant à la température la plus élevée se situe au-dessus de celle correspondant à la température la plus basse; cependant ce fait, qui n'a pas pu être confirmé avec certitude en raison de l'incertitude des méthodes de sorption dans cette zone, demanderait une étude approfondie. Ce phénomène ne peut d'ailleurs apparaître sur nos courbes de désorption de blé (cf. Chap. III) qui, en raison de limitations techniques (moisissures) n'ont pu être établies aux très hautes H.R.

c) Mesures de la pression développée dans l'enceinte pendant le choc thermique

Afin de vérifier les indications obtenues avec l'hygromètre SINA, il nous a semblé intéressant de mesurer la pression régnant dans l'enceinte de choc thermique, pour une température donnée; en effet, cette pression doit être la somme de l'augmentation de pression due à la dilatation des gaz, et de la pression de vapeur d'eau désorbée.

Le dispositif expérimental approprié qui a dû être mis en oeuvre va tout d'abord être décrit.

α. Dispositif expérimental

Il est impossible de mesurer la pression régnant entre les plaques à l'aide d'un manomètre ordinaire; en effet, d'une part l'organe sensi-

ble du manomètre représente un volume mort important vis-à-vis de celui de l'enceinte, d'autre part, il fait effet de paroi froide par rapport aux plaques et se trouve être le siège d'une condensation d'eau. Le dispositif suivant qui permet une mesure à volume constant a été réalisé: la plaque est connectée à l'une des branches d'un manomètre différentiel en verre épais, garni de mercure ; l'autre branche est connectée à un mano-détendeur à l'aide duquel on maintient une pression différentielle nulle ; un manomètre métallique sensible permet de mesurer la contre-pression nécessaire à l'équilibre ; l'ensemble plaque et manomètre différentiel est plongé dans un bain thermostaté à cuve en verre permettant l'observation (fig. 9).

Ce dispositif a été contrôlé en mesurant la pression régnant dans une ampoule à moitié remplie d'eau, et dont le volume gazeux contient de l'air et de la vapeur d'eau sous pression saturante.

Sur la figure 11, la courbe en tracé continu correspond à la pression calculée grâce à l'équation d'état du système : (SUARDET, 1965)

$$(p - p_s) V = n_1 R T$$

où p est la pression sous laquelle le corps liquide est vaporisable, p_s , la pression de vapeur saturante, V , le volume de la phase gazeuse, n_1 , le nombre de moles du gaz non liquéfiable, et T , la température absolue.

Partant de l'état 1 (20°C) pour aboutir à l'état 2, on a :

$$\frac{n_1 R}{V} = \frac{p_1 - p_{s1}}{T_1} = \frac{p_2 - p_{s2}}{T_2}$$

En considérant que :

p_1 est la pression atmosphérique (1,03 kg/cm²),

$T_1 = 273 + 20 = 293$ °K,

p_{s1} , pression de vapeur à 20°C, est égal à 0,025 kg/cm²,

$R = 0,082057$ litre/atm . mole⁻¹ °K,

p_2 est la pression du système à la température T_2 ,

l'équation donnant la pression régnant dans l'ampoule, en fonction de la température est :

$$p_2 = p_{s2} + T_2 \cdot \left(\frac{1,033 - 0,025}{293} \right)$$

soit

$$p_2 = p_{s2} + T_2 \cdot 3,32 \cdot 10^{-3}$$

On voit sur la figure 11 qu'il y a une excellente concordance entre les points calculés et les points expérimentaux ; ceci confirme donc que le dispositif mis en oeuvre répond au but recherché.

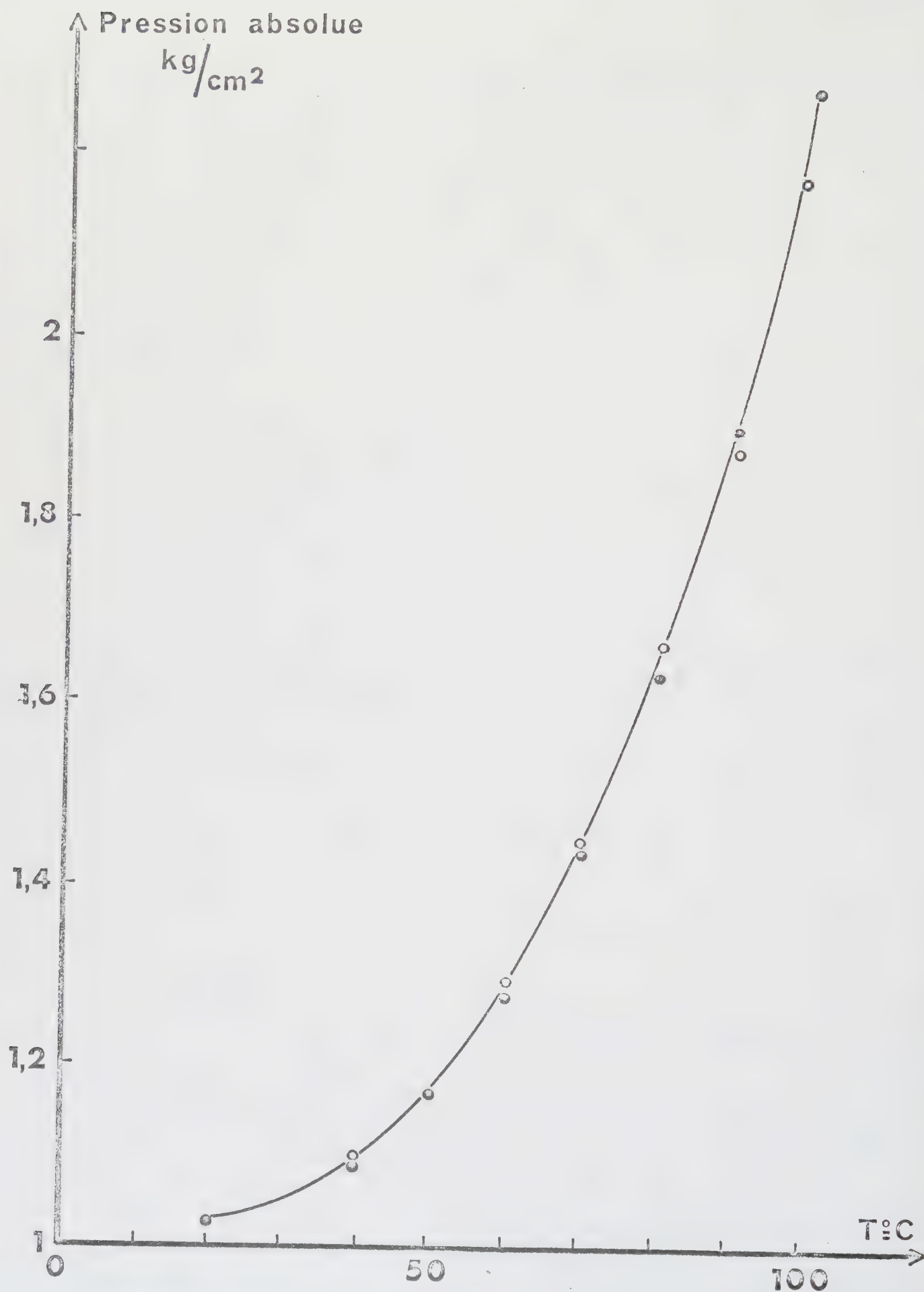


Figure 11 - Essai de contrôle du dispositif de mesure de pression, effectué sur l'enceinte étanche remplie d'eau pure.

- - valeurs expérimentales
- - valeurs calculées

β) Mesure de la pression dans les enceintes pour choc thermique.

Pour un blé à une hydratation donnée, on a systématiquement mesuré la pression développée en fonction de la température du traitement, en attendant chaque fois suffisamment longtemps afin d'être sûr que l'équilibre soit atteint.

Les figures 12 et 13 montrent les résultats obtenus avec du blé hydraté à 16 p.100 et à 35 p.100 inactivé par un chauffage préalable de 1/2 heure à 100°C, afin de supprimer les phénomènes vitaux.

On observe que, jusqu'à la température de 65°C environ, la valeur expérimentale coïncide assez bien avec la courbe calculée en supposant les caractéristiques du modèle additives (la pression dans l'enceinte est la somme de la pression due à la dilatation du gaz et de la pression de vapeur d'eau supplémentaire due à la désorption, appréciée sur la courbe de désorption).

Mais au-delà de 65°C, la pression mesurée devient inférieure à la pression calculée et, vers 100°C, elle devient égale à la seule pression de vapeur d'eau.

La courbe (c) sur les figures 12 et 13 représente la pression de vapeur d'eau dans l'enceinte (différence entre la pression totale mesurée et la pression due à la dilatation). On voit que, par exemple, à 16 p.100 d'eau et à 90°C, cette pression de vapeur d'eau est de 0,530 kg/cm² : cela correspond à une H.R. de 74 p.100 environ. Cette valeur est plus élevée que celle observée avec l'hygromètre SINA (63,5 p.100), mais toutefois nettement inférieure à celle déduite des courbes de désorption (>95 p.100).

Ainsi, comme la dilatation des gaz ne peut être mise en cause, il faut admettre que c'est la pression de vapeur qui ne se développe pas normalement, tout se passant comme si la désorption des molécules d'eau était très fortement ralentie de telle sorte que, dans la durée de l'expérience, un faux équilibre soit atteint. En tout état de cause, ces essais de pression confirment les résultats obtenus avec l'hygromètre SINA.

Par ailleurs, des essais ont été réalisés avec du blé vivant. Dans le cas du blé à 35 p.100, la pression est légèrement plus forte avec le blé vivant : on peut supposer que la respiration des grains au début augmente la pression par dégagement de CO₂ et H₂O. Cependant, dans le cas du blé à 16 p.100, c'est le contraire qui se produit : la pression est la plus forte avec le blé inactivé.

Des réactions d'oxydation non enzymatique ne sont pas à craindre : en effet, les essais faits sous vide (sachets aluminium-polyéthylène) n'ont pas montré de différence avec ceux effectués en présence d'air. D'ailleurs, la plupart des expériences ont été réalisées à des humidités pour lesquelles les oxydations sont inhibées.

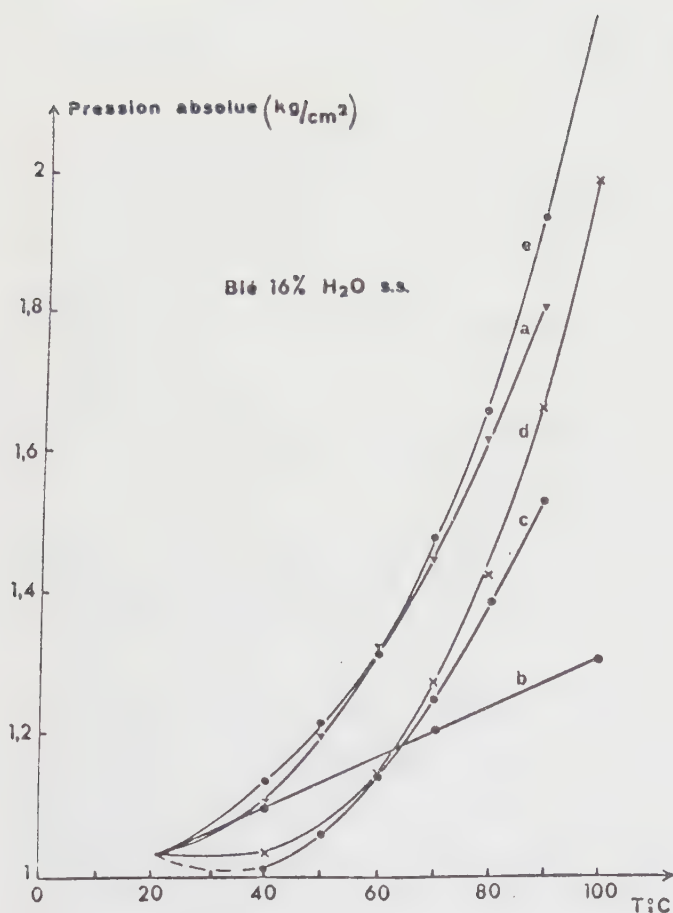
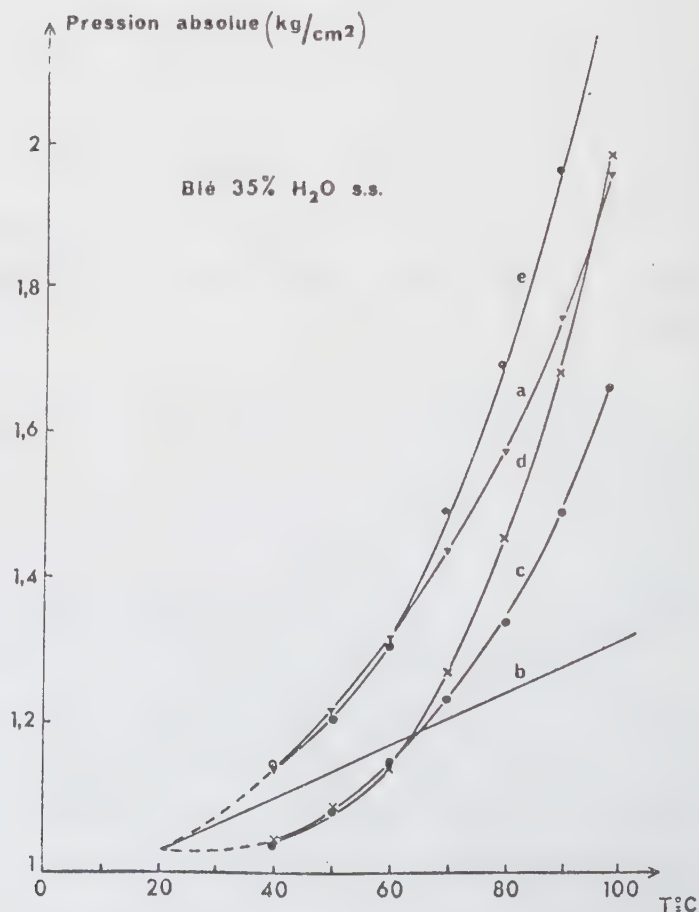


Figure 12 - Mesure de la pression développée en fonction de la température dans l'enceinte étanche remplie de blé à une teneur en eau de 16°/o et préalablement inactivé.

- a - pression mesurée.
- b - pression due à la dilatation des gaz.
- c - pression de vapeur d'eau réelle (a-b).
- d - pression de vapeur d'eau déduite des courbes de désorption.
- e - somme (d + b).

Figure 13 - Mesure de la pression développée en fonction de la température dans l'enceinte étanche remplie de blé à une teneur en eau de 35°/o et préalablement inactivé.

- a - pression mesurée.
- b - pression due à la dilatation des gaz.
- c - pression de vapeur d'eau réelle (a-b).
- d - pression de vapeur d'eau déduite des courbes de désorption.
- e - somme (d + b).



d) Refroidissement des plaques

Au cours du refroidissement, une importante condensation d'eau liquide se fait sur les parois. Ce phénomène a été vérifié en utilisant des plaques en plexiglas. Ce même dispositif nous a permis de vérifier qu'il n'y a jamais présence d'eau liquide au cours du chauffage. Assez rapidement (après 1/2 heure), l'eau condensée s'évapore et se réadsorbe dans le blé ; ceci laisse penser que le phénomène est très superficiel.

e) Durée des transferts de chaleur

Afin de mesurer la durée des équilibres thermiques dans les plaques, nous avons utilisé un thermocouple Cu-Co très fin ; la f.e.m. est enregistrée sur le potentiomètre MECI, avec une soudure de référence plongée dans la glace. Une série de grains est enfilée sur le thermocouple afin de limiter l'erreur due à la conduction par le thermocouple lui-même. Les cinétiques d'équilibre thermique sont présentées sur la figure 14. ; on voit que la durée d'équilibre n'excède jamais 3 minutes, tant au chauffage qu'au refroidissement.

f) Conclusion

Ainsi les mesures d'H.R., de pression et de durée font apparaître, que lorsque le grain est chauffé dans les plaques, la teneur en eau du grain demeure bien constante, ce qui était notre souci initial.

Il semble y avoir un refus, ou un retard très grand, de désorption quand une substance est chauffée seule, dans un espace restreint, c'est-à-dire en dehors de la présence d'un dispositif régulateur d'H.R. qui impose une certaine valeur (soit solution d'acide ou de sel, soit courant d'air conditionné). Ce phénomène intéressant mériterait à lui seul une étude.

Quoi qu'il en soit, il se produit une modification dans la répartition de l'énergie des liaisons de l'eau dans la substance, modification qui demande environ 1/4 d'heure, alors que l'équilibre thermique proprement dit est beaucoup plus rapide (2 à 3 minutes) ; au cours de cette modification, le degré de liberté de l'eau augmente.

Le fait que le choc thermique ait finalement lieu sous pression ne saurait ajouter un effet dénaturant supplémentaire, le domaine des pressions dénaturantes, de l'ordre de 1000 à 8000 kg/cm² (JOLY, 1965) étant très au-delà de la pression atteinte entre les plaques.

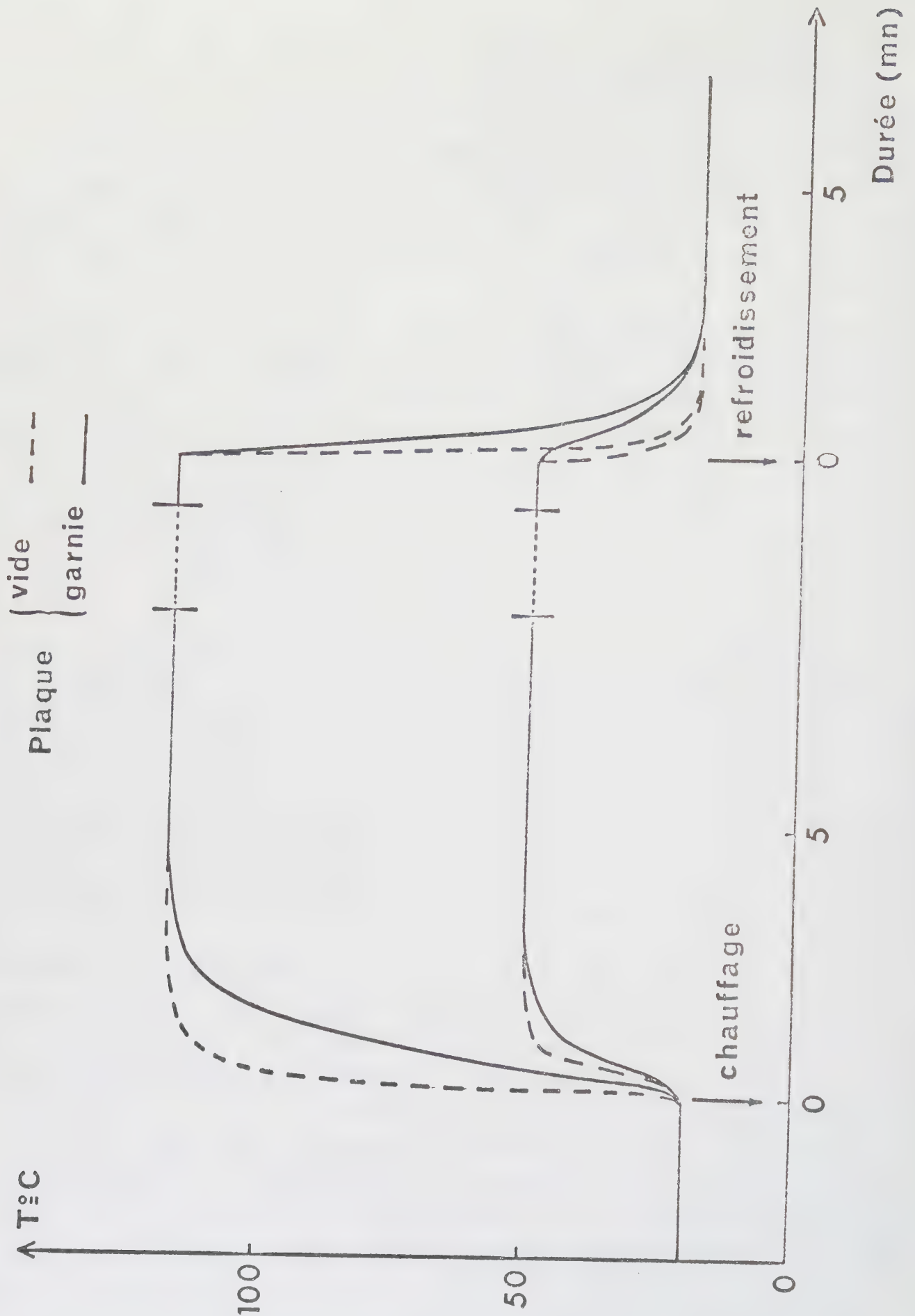


Figure 14 - Cinétiques de mise en équilibre thermique de l'air et du blé, enregistrées à l'aide d'un thermocouple, au cours d'un choc thermique, à l'intérieur de l'enceinte étanche, (plaque dural).

2 - Influence des conditionnements sur les tests pratiqués, en l'absence de choc thermique

Les conditionnements imposés par le protocole expérimental (humidification, séchage) peuvent par eux-mêmes avoir un effet sur la réponse des tests étudiés.

En ce qui concerne la ribonucléase pancréatique, aucun effet ne peut être décelé. Par contre, l'activité RNasique du blé témoin conditionné augmente légèrement par rapport au blé n'ayant subi aucun traitement au cours du séchage effectué à température ambiante. Cette augmentation d'activité se produit également au cours du stockage de longue durée. Il n'est pas possible d'éviter ce phénomène dans notre protocole expérimental par une cryodéshydratation : en effet, la congélation de grain humide entraîne des lésions tissulaires importantes par formation de cristaux de glace, et l'extraction ultérieure de l'enzyme s'en trouve modifiée. La seule possibilité est d'accélérer le séchage en utilisant de l'air très sec, à température moyenne (20-25°C).

Le Temps moyen de germination est également affecté par le conditionnement ; en effet, le grain germe d'autant plus vite qu'il est plus hydraté au départ. Le grain humidifié puis séché acquiert, au cours de l'humidification, une avance en germination et la conserve au moins un certain temps après séchage. Ceci tendrait à montrer que ce n'est pas tant la teneur en eau qui est le facteur important, mais plutôt un certain état de gonflement du grain, ou de déchirure des enveloppes ; cet "état" persiste après séchage et facilite beaucoup l'imbibition. A l'inverse, un séchage suivi d'une réhumidification ne modifie pratiquement pas le Tm. L'effet d'une humidification préalable serait en somme comparable à celle d'un traitement ultra-sonore sur le grain : accélérer la pénétration de l'eau (OBOLENSKY, 1957) ; il y a là un phénomène qui serait intéressant à étudier plus en détail.

Quoi qu'il en soit, nous constatons que le protocole expérimental - humidification, séchage - peut à lui seul, en dehors de tout traitement thermique, modifier l'activité RNasique et le Tm ; par conséquent, pour dégager les effets des traitements thermiques, il est nécessaire de faire pour chaque expérience un témoin conditionné, mais non choqué ; dans l'exposé de nos résultats nous considérerons toujours l'activité RNasique et le Tm d'un échantillon traité rapportés à ceux du témoin non traité.

3 - Essais sur RNase pancréatique

Les conditions imposées par le protocole expérimental sont assez difficiles. En effet, d'une part, la teneur en eau n'étant connue que par l'intermédiaire de la courbe de sorption, sa connaissance est relativement imprécise ; d'autre part, la pesée de 1 mg de substance

effectuée sur une balance permettant d'apprécier le 1/20 mg entre deux graduations, réclame beaucoup de soins (protection contre les poussières, stabilisation de l'H.R.) et peut être facilement faussée.

Le plus gros danger réside dans la variation très rapide de la teneur en eau de la substance quand son H.R.E. est éloignée de celle de l'air ambiant ; malgré toutes les précautions prises, certaines imprécisions trouvent là leur origine.

- CHAPITRE III - RESULTATS OBTENUS -

Les résultats obtenus au cours de ce travail peuvent être répartis en trois groupes :

- les effets du choc thermique à teneur en eau constante sur le blé, appréciés par la mesure de l'activité ribonucléasique extractible et par la perte de viabilité (mesure du Temps moyen de germination) ;
- l'inactivation thermique de la ribonucléase pancréatique solide et en solution ;
- quelques aspects complémentaires ayant plutôt la valeur de sondages : évolution de l'affinité pour l'eau (sorption), évolution des groupes sulfhydriles et des ponts disulfures, activité amylasique et protéolytique.

En ce qui concerne les deux premiers aspects, il a été choisi, pour des raisons qui seront justifiées au chapitre IV (discussion des résultats), d'exprimer les résultats de la façon suivante : a et T_m étant respectivement l'activité ribonucléasique et le Temps moyen de germination au temps t du traitement thermique, a_0 et T_{m_0} les mêmes valeurs au temps zéro (témoins), on considère uniquement le logarithme du rapport de la valeur du paramètre à l'instant t à celle du témoin,

$$\log_{10} \frac{a}{a_0} \quad \text{et} \quad \log_{10} \frac{T_m}{T_{m_0}}$$

I - CHOCs THERMIQUES SUR LE BLE

A. ACTIVITE AMYLASIQUE ET PROTEOLYTIQUE

Afin d'avoir un élément de comparaison pour apprécier la sensibilité thermique de la ribonucléase extractible du blé, l'inactivation de l'amylase et de la protéase a été suivie, à deux températures différentes, sur le blé à la teneur en eau de 35 p.100. On observe (fig.15) que la sensibilité de la ribonucléase est beaucoup plus grande, toutes choses égales par ailleurs, que celles de ces deux systèmes enzymatiques.

$T = 54^{\circ}\text{C}$
 $\text{H}_2\text{O} = 35\% \text{ s.s.}$

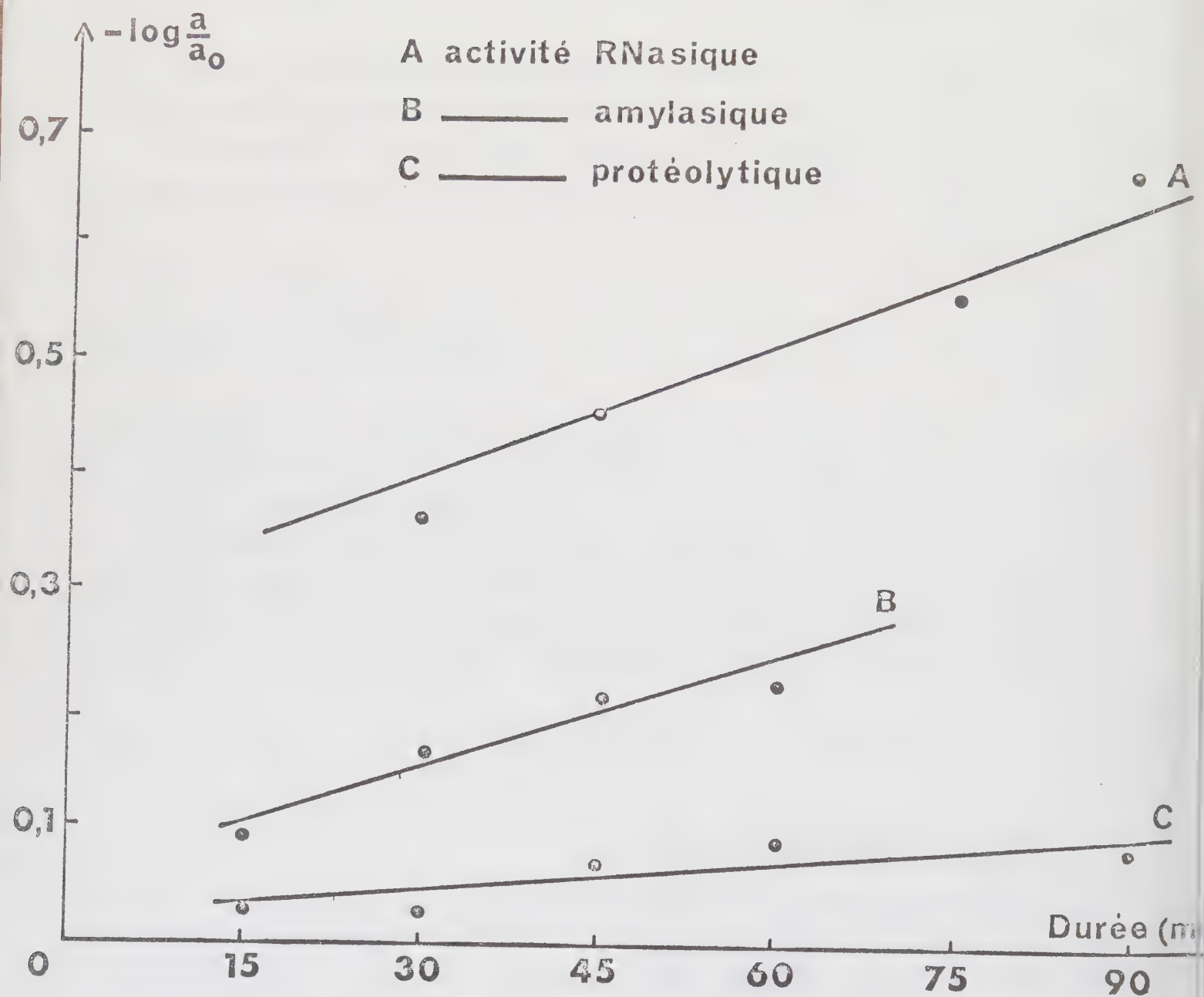


Figure 15 - Evolution comparée des activités RNasique, amylasique et protéolytique au cours d'un choc thermique effectué sur du blé à 35% (s.s.) d'hydratation et à 54°C.

B. ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE ET TEMPS MOYEN DE GERMINATION.

Les effets du choc thermique ont été étudiés pour chacune des combinaisons teneur en eau - température indiquées dans le tableau 6.

Tableau 6 - Chocs thermiques effectués sur le blé : températures choisies pour chaque teneur en eau dans le cas de la mesure de l'activité RNasique et dans celui de la mesure du Tm.

Teneur en eau p.100 s.s.	Température de chauffage °C	
	RNase	Germination
4,5	125 - 132	-
14	86 - 90	65 - 72
22	68 - 74	58 - 62
30	54 - 62	54 - 62
35	45-50-54-56-58-62	45-50-54-56-58-62
45	40 - 45	-

Dans chaque cas, les effets de 6 à 12 chocs thermiques de durées croissantes allant de 2 minutes à 6 heures, ont été examinés.

Les figures 16 et 17 montrent l'allure des courbes isothermes obtenues dans le cas de l'essai pratiqué sur le blé à la teneur en eau de 35 p.100, du double point de vue activité enzymatique et temps moyen. On observe, dans les deux cas, une allure caractéristique, avec deux phases linéaires successives ; les segments de droite figurés ont été calculés selon la méthode des moindres carrés, les coefficients de corrélation correspondants montrant une liaison très significative.

On note qu'il semble exister une relation linéaire, d'une part, entre la température et l'abscisse à l'origine de la première phase, d'autre part, entre cette température et l'ordonnée à l'origine de la seconde phase (fig. 18).

Les essais relatifs aux teneurs en eau autres que 35 p.100 dont les résultats sont consignés dans les tableaux 7 et 8, permettent de dégager des allures de courbes tout à fait comparables.

35%.

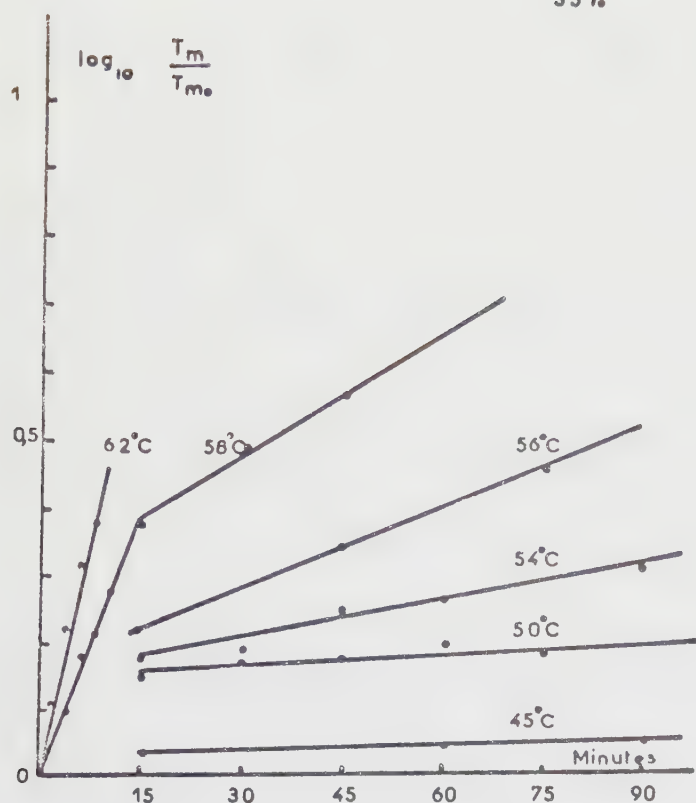
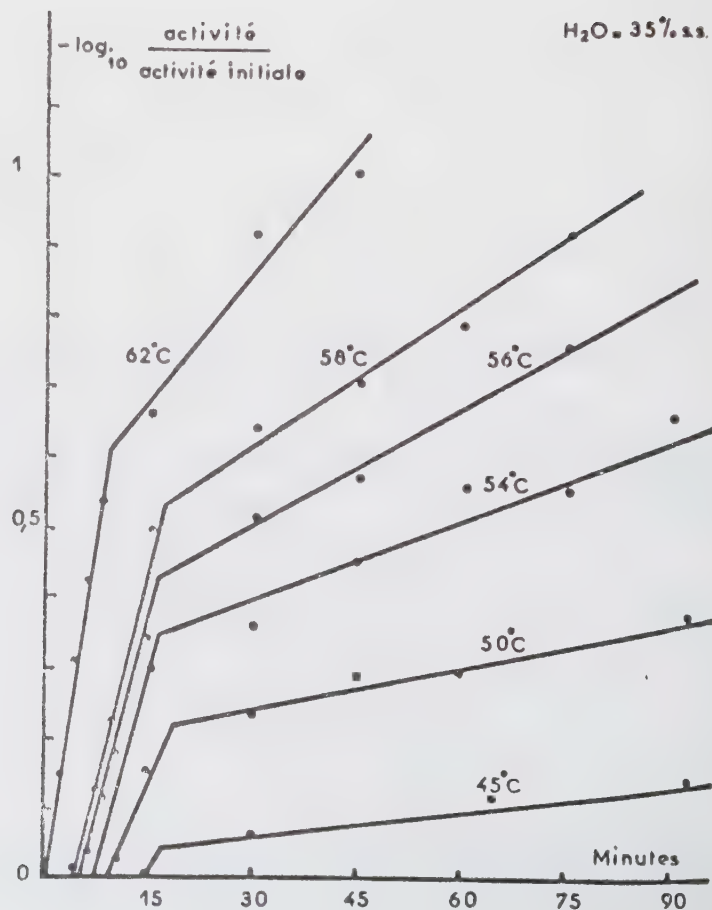


Figure 16 - Augmentation relative du Temps moyen de germination du blé hydraté à 35% S.S. en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante, à diverses températures.

Figure 17 - Diminution relative de l'activité de la RN-ase extractible du blé, hydraté à 35% S.S., en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante, à diverses températures.



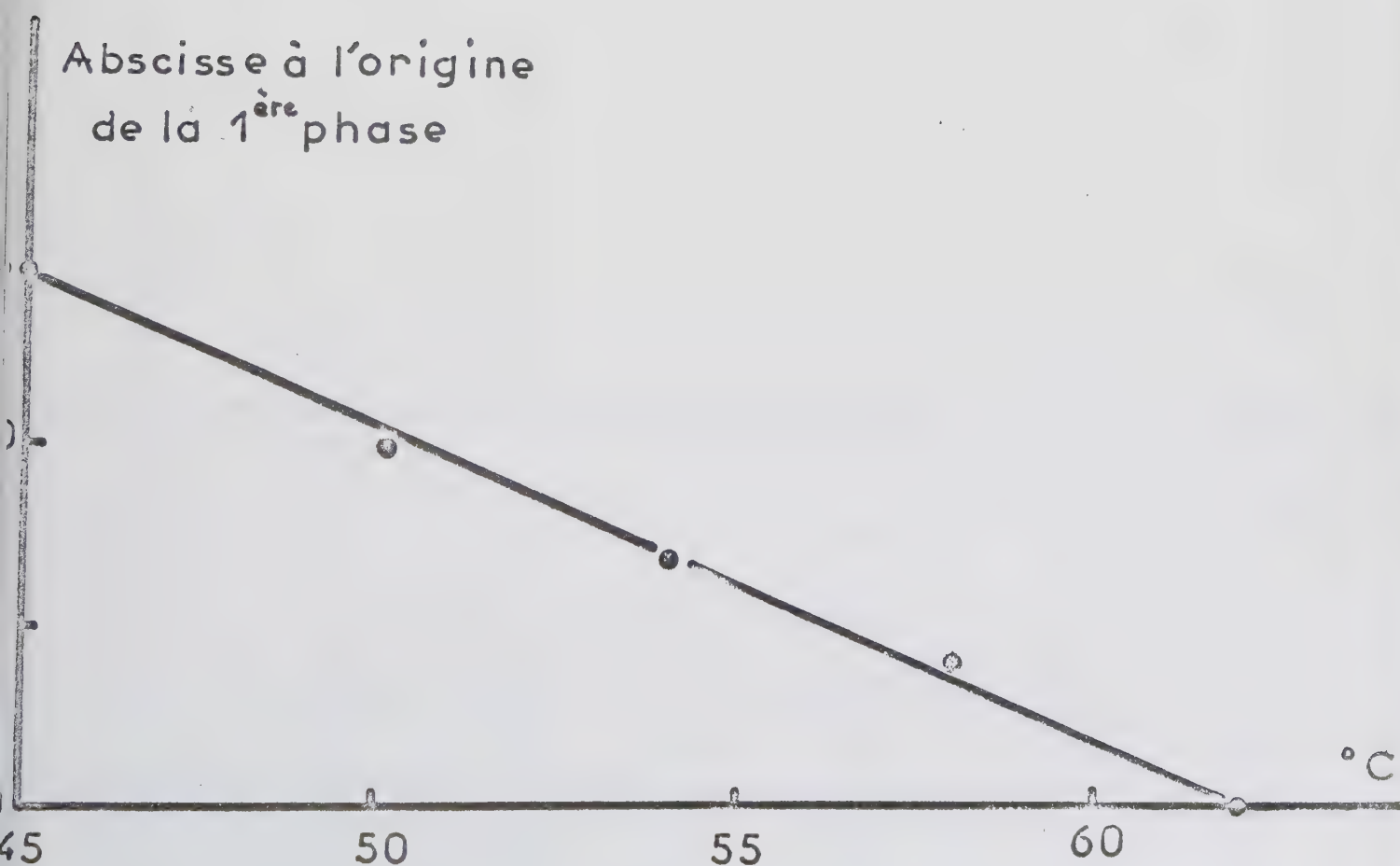
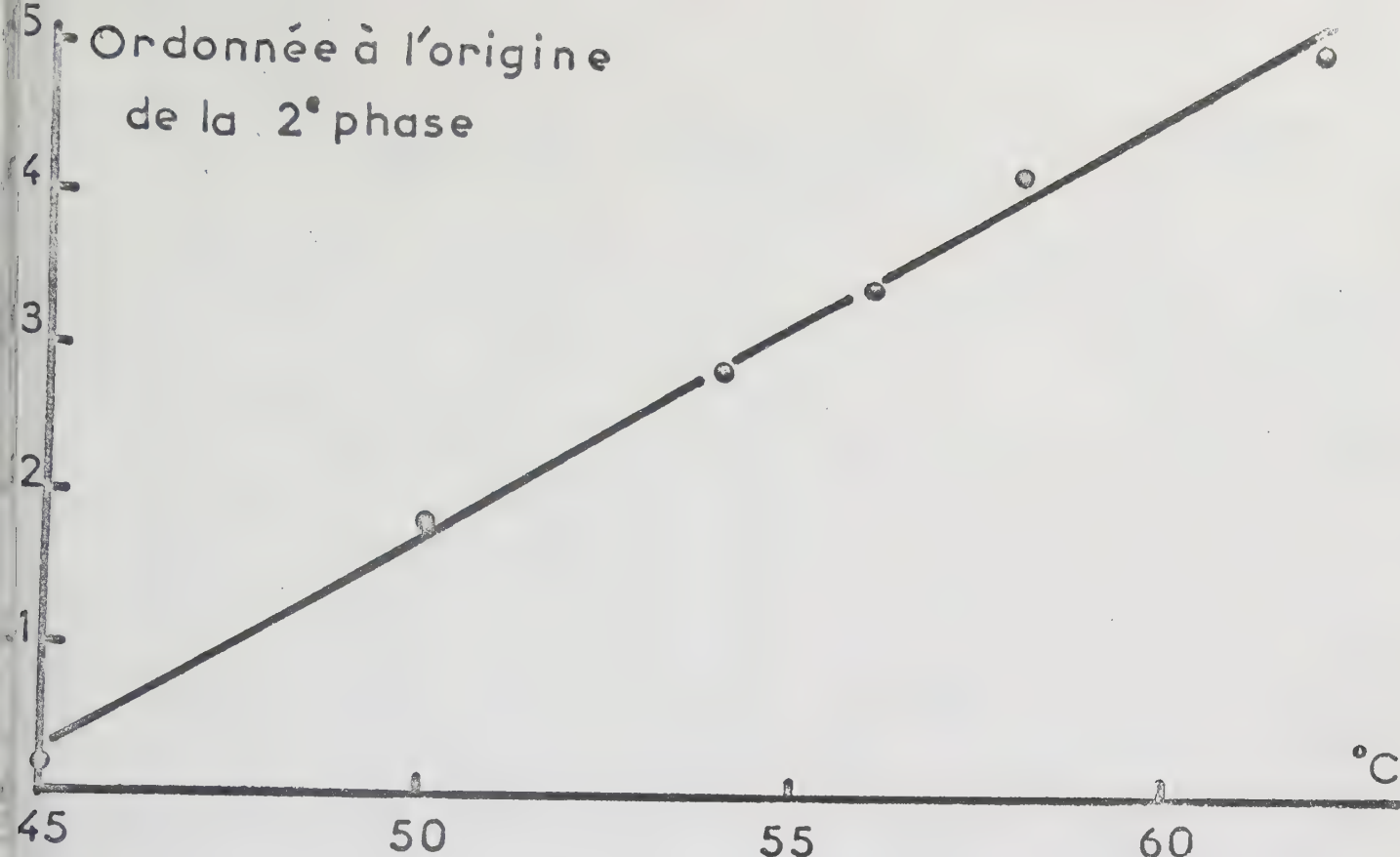


Figure 18 - Relation linéaire entre la température du choc thermique et, d'une part l'ordonnée à l'origine de la deuxième phase de dénaturation, d'autre part l'abscisse à l'origine de la première phase telles qu'elles sont définies sur les courbes cinétiques. Fig. 17.

Tableau 7. - Analyse des distributions des durées de germination des grains ayant subi un choc thermique.

Teneur en eau % s.s.	Température °C	Durée min.	Tm heures	Effectif (= pouvoir germinatif)	Variance	$\frac{T_m}{T_{m_0}}$	$+\log_{10} \frac{T_m}{T_{m_0}}$
14		0	41,48	94	62,17	1,000	0,000
	65	10	48,11	91	80,61	1,159	0,064
		15	46,15	92	53,70	1,112	0,046
		30	53,73	91	74,61	1,295	0,112
		60	58,52	92	59,90	1,410	0,149
	72	3	47,16	93	50,03	1,136	0,055
		5	48,86	95	42,40	1,177	0,071
		10	60,55	89	78,26	1,459	0,164
		15	70,81	88	87,03	1,707	0,232
		30	95,36	75	206,19	2,298	0,361
22		0	42,65	97	50,47	1,00	0,000
	58	10	43,19	92	81,35	1,012	0,005
		15	43,95	90	89,63	1,030	0,012
		30	46,68	87	80,48	1,094	0,039
		45	51,07	89	123,78	1,197	0,078
		60	53,34	87	121,58	1,250	0,096
	62	8	45,16	89	53,62	1,058	0,024
		15	54,08	82	116,57	1,267	0,103
		30	61,54	60	119,49	1,442	0,159
30		0	29,18	89	-	1,000	0,000
	54	9	32,89	89	55,73	1,127	0,051
		12	35,22	92	52,94	1,206	0,081
		15	36,25	95	70,67	1,242	0,094
		30	40,94	93	83,34	1,403	0,147
		60	43,14	93	107,87	1,478	0,169
		90	45,78	88	83,86	1,568	0,195
	62	9	56,92	81	273,10	1,950	0,290
		12	68,98	64	180,98	2,363	0,373
		15	72,83	49	196,42	2,495	0,397
		30	90,52	8	69,00	3,102	0,491

Tableau 7. - (suite)

Teneur en eau % s.s.	Tempé- rature °C	Durée min.	Tm heures	Effectif (= pouvoir germinatif)	Variance	$\frac{T_m}{T_{m_0}}$	$+\log_{10} \frac{T_m}{T_{m_0}}$
35	45	0	27,00	90	66,77	1,000	0,000
		15	28,91	95	64,22	1,071	0,030
		60	29,59	92	63,12	1,096	0,040
		90	30,32	97	60,31	1,122	0,049
	50	0	18,63	95	41,38	1,000	0,000
		15	25,91	96	56,92	1,390	0,143
		30	27,38	98	83,78	1,469	0,167
		45	27,61	94	34,9	1,482	0,170
		60	29,11	95	14,31	1,562	0,193
		75	28,55	97	55,89	1,532	0,185
	54	0	18,63	95	41,38	1,000	0,000
		15	28,00	96	41,05	1,502	0,176
		30	28,70	97	52,91	1,540	0,187
		45	34,75	96	62,25		0,245
		60	33,94	96	98,65	1,821	0,260
		90		97	161,04		0,305
	56	0	27,00	90	66,77	1,000	0,000
		15	44,51	90	91,53	1,648	0,216
		45	60,33	80	125,24	2,234	0,349
		75	77,21	48	164,36	2,859	0,456
	58	0	22,77	88	68,37	1,000	0,000
		2	28,48	95	54,0	1,250	0,096
		4	28,55	94	115,7	1,253	0,097
		6	34,92	93	106,0	1,533	0,185
		8	37,34	91	190,7	1,639	0,214
		10	43,01	91	141,6	1,888	0,276
		15	53,89	88	182,2	2,366	0,374
		30	70,83	60	225,8	3,110	0,492
		45	84,59	17	203,4	3,714	0,569
		60	88,40	5	223,0	3,882	0,589
	62	0	26,32	94	57,9	1,000	0,000
		2	33,81	84	209,8	1,284	0,108
		4	43,58	72	177,9	1,655	0,218
		6	54,20	49	256,0	2,059	0,313
		8	62,67	30	168,7	2,381	0,376
		10	57,73	30	151	2,193	0,341

Tableau 8. - Activité RN-asiqne extractible du blé après choc thermique

(Les résultats relatifs à la teneur en eau de 35%, représentés sur la figure 17., ne figurent pas dans ce tableau).

Teneur en eau °/° s.s.	Température °C	Durée min.	Activité RN-asiqne a (*)	Activité résiduelle $\frac{a}{a_0}$ $a_0=0,555$	$-\log_{10} \frac{a}{a_0}$
4,5	125	10	0,542	0,977	0,010
		15	0,500	0,901	0,045
		30	0,461	0,831	0,080
		60	0,392	0,707	0,150
	132	2	0,542	0,977	0,010
		9	0,379	0,683	0,165
		15	0,315	0,568	0,245
		30	0,250	0,451	0,345
		60	0,171	0,309	0,510
		75	0,139	0,251	0,600
	86	5	0,511	0,922	0,035
		10	0,420	0,758	0,120
		30	0,294	0,530	0,275
		60	0,177	0,319	0,495
		75	0,139	0,251	0,600
	90	3	0,482	0,870	0,060
		8	0,362	0,653	0,185
		15	0,218	0,393	0,405
		30	0,159	0,288	0,540
		60	0,074	0,134	0,870

(*) L'activité est exprimée en densité optique telle qu'elle est obtenue dans les conditions standard du dosage - (cf Methodes), avec en particulier, une dilution finale du surnageant de 1 à 15. L'activité a_0 du témoin non traité s'est maintenue à une valeur constante $a_0 = 0,555$.

Teneur en eau °/°s.s.	Température °C	Durée min.	Activité RN-asique a	Activité résiduelle a/a ₀ a ₀ = 0,555	- log ₁₀ $\frac{a}{a_0}$
22	68	10	0,506	0,912	0,040
		15	0,308	0,555	0,255
		30	0,265	0,478	0,320
		45	0,194	0,350	0,455
		60	0,142	0,257	0,590
	74	3	0,456	0,822	0,085
		8	0,330	0,595	0,225
		15	0,208	0,375	0,425
		30	0,147	0,266	0,575
		45	0,097	0,175	0,755
		60	0,067	0,121	0,915
30	54	10	0,555	1,000	0,000
		15	0,536	0,966	0,015
		18	0,482	0,870	0,060
		21	0,445	0,803	0,095
		30	0,401	0,724	0,140
		60	0,370	0,668	0,175
		90	0,326	0,588	0,230
	62	6	0,461	0,831	0,080
		9	0,370	0,668	0,175
		12	0,301	0,543	0,265
		15	0,241	0,436	0,360
		30	0,203	0,367	0,435
		60	0,167	0,301	0,520
		90	0,132	0,239	0,620
45	40	15	0,524	0,944	0,025
		35	0,466	0,841	0,075
		60	0,392	0,707	0,150
	45	5	0,488	0,881	0,055
		10	0,392	0,707	0,150
		15	0,345	0,623	0,205
		30	0,268	0,484	0,315
		45	0,210	0,380	0,420
		60	0,169	0,305	0,515

En outre, le taux de protéines de l'extrait RNasique a été suivi en fonction de la durée du choc thermique. Aucune variation significative n'a pu être décelée, même pour les chocs les plus sévères, ainsi que le montre la figure 19, dans le cas du blé à une teneur en eau de 35 p.100. Pour les autres teneurs en eau, ce taux n'a pas été suivi systématiquement mais des sondages ont été effectués, qui ont toujours confirmé ce résultat. Ceci montre que les variations d'activité observées ne peuvent être imputées à des variations du taux d'extraction.

Cependant, il faut noter que le taux de protéines ainsi mesuré est celui de l'extrait RNasique après purification par précipitation fractionnée ; le fait qu'il soit constant ne signifie pas que le taux global des protéines solubles du blé demeure invariable : bien au contraire, HARRISON (1969) montre une variation liée au pouvoir germinatif. Il semble donc que ces protéines dont le taux varie en fonction du traitement thermique sont éliminées au cours de la purification.

Malgré tout l'intérêt que représente un essai de choc thermique sur du blé complètement déshydraté, celui-ci n'a pu être réalisé ; en effet le séchage total du blé entier ne peut être fait que grâce à un traitement très long qui par lui même est déjà dénaturant (mise sous vide, chauffage), les résultats ne seraient plus comparables à ceux obtenus aux autres teneurs en eau. Par contre un tel essai a pu être fait sur la RNase pancréatique solide, dont la déshydratation totale est plus facile à réaliser.

C. COURBE DE SORPTION

Les courbes de sorption de blé ont été établies par la méthode n°2, avant et après deux chocs thermiques d'une durée respective de 15 minutes et de 1 heure 30, effectués à 60°C, et à la teneur en eau de 31 p.100. Sur la figure 20, on note l'existence de légères différences montrant que le blé traité a moins d'affinité pour l'eau, sans d'ailleurs que l'on puisse attribuer cet effet aux composants protéiques ou glucidiques du grain.

Par ailleurs, afin de faciliter, soit la réalisation de certains essais, soit l'interprétation des résultats, les courbes de sorption et de désorption de blé entier broyé ont été réalisées avec la méthode n°1, à diverses températures ; les figures 21 et 22 présentent ces courbes.

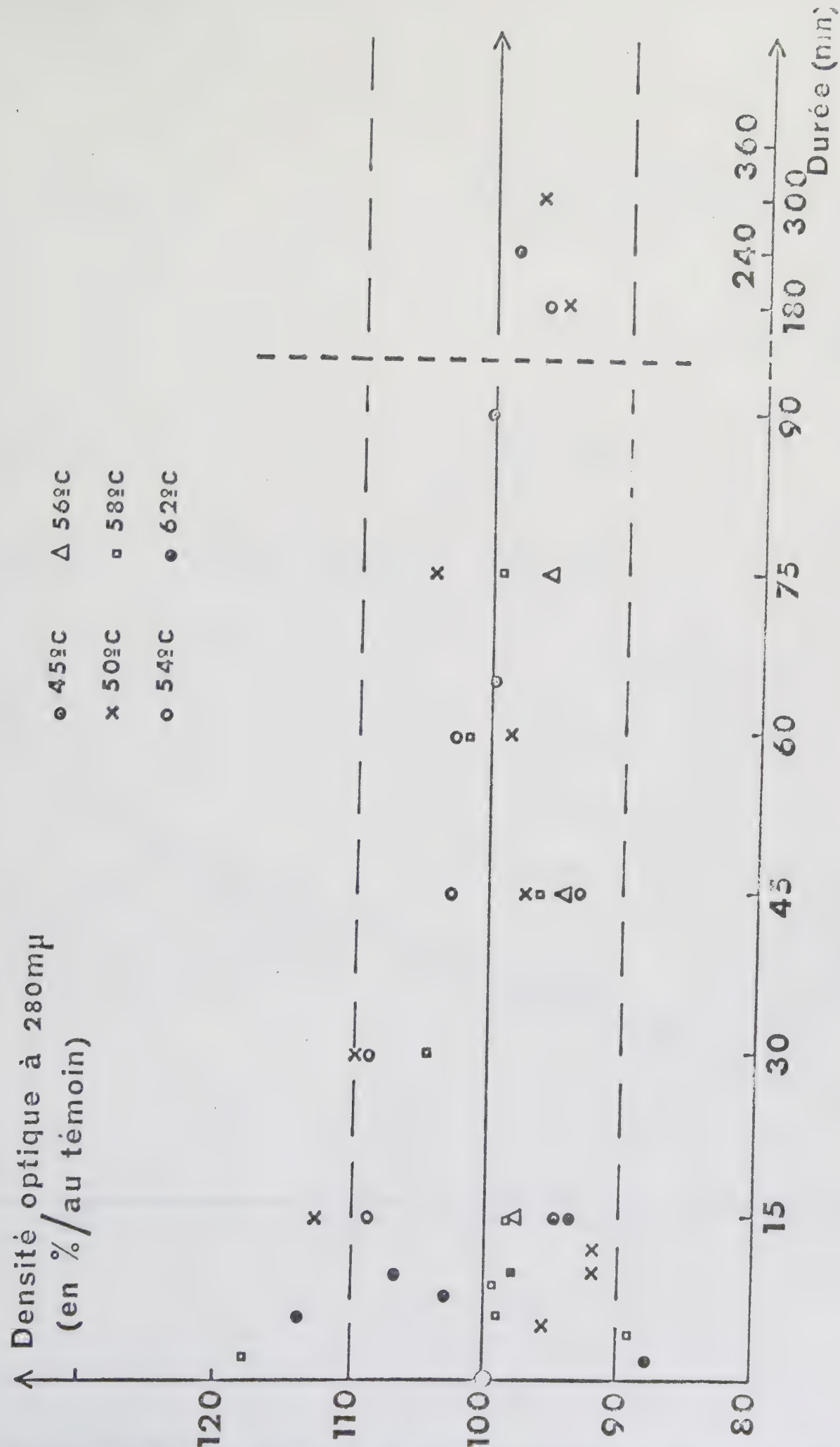


Figure 19 - Variation non significative du taux de protéines de l'extrait aqueux de blé, mesuré par spectrophotométrie, en fonction de la durée du choc thermique subi par le blé à 35% d'hydratation pour diverses températures.

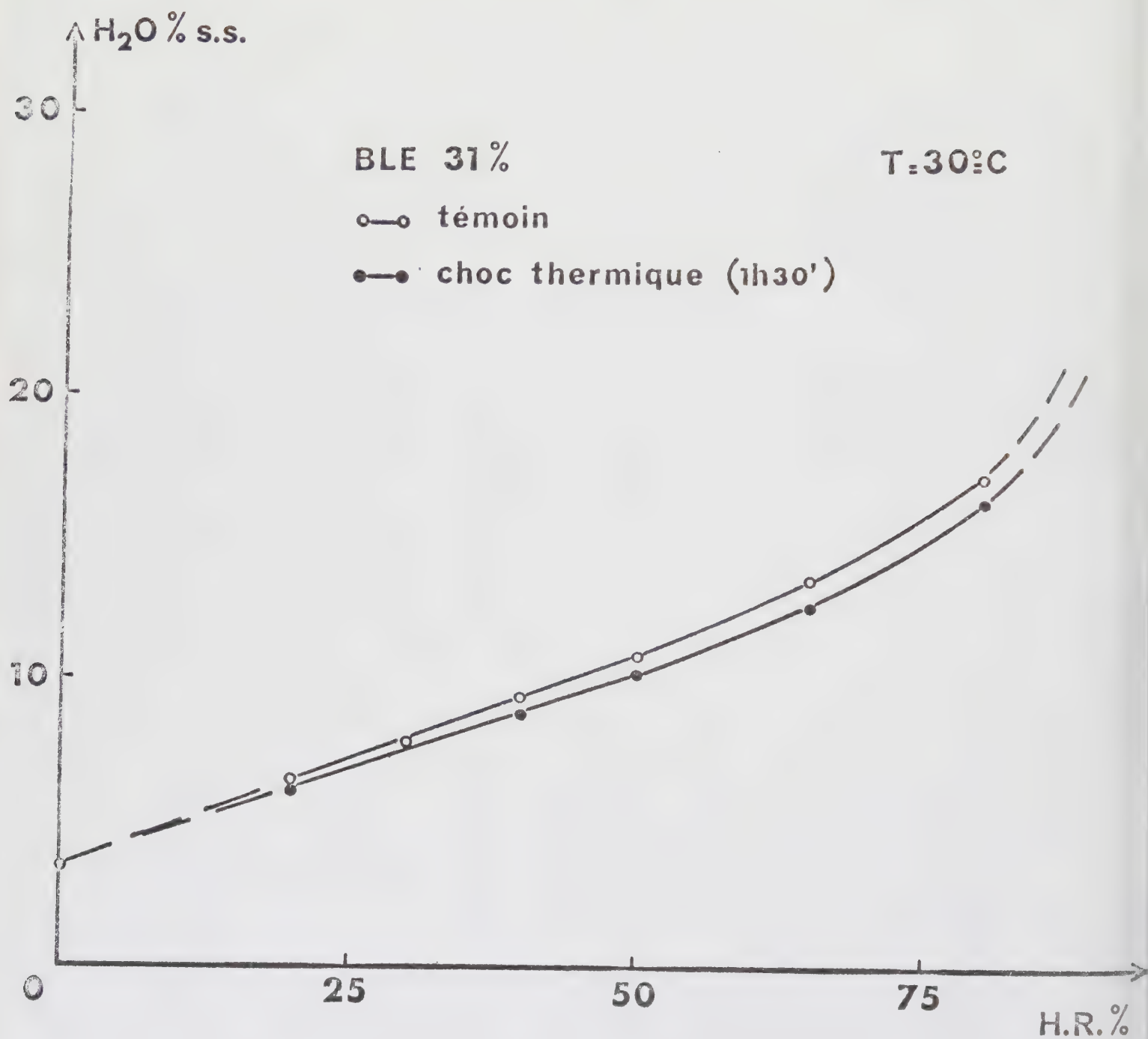


Figure 20 - Courbe de sorption de la vapeur d'eau par le blé avant et après un choc thermique réalisé à une hydratation de 31‰ et à 62°C pendant 1h30'.

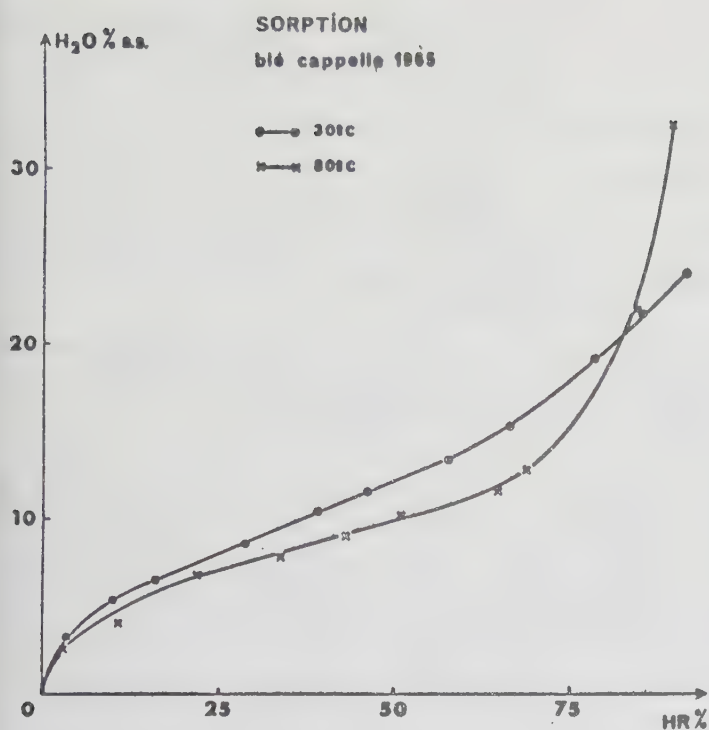
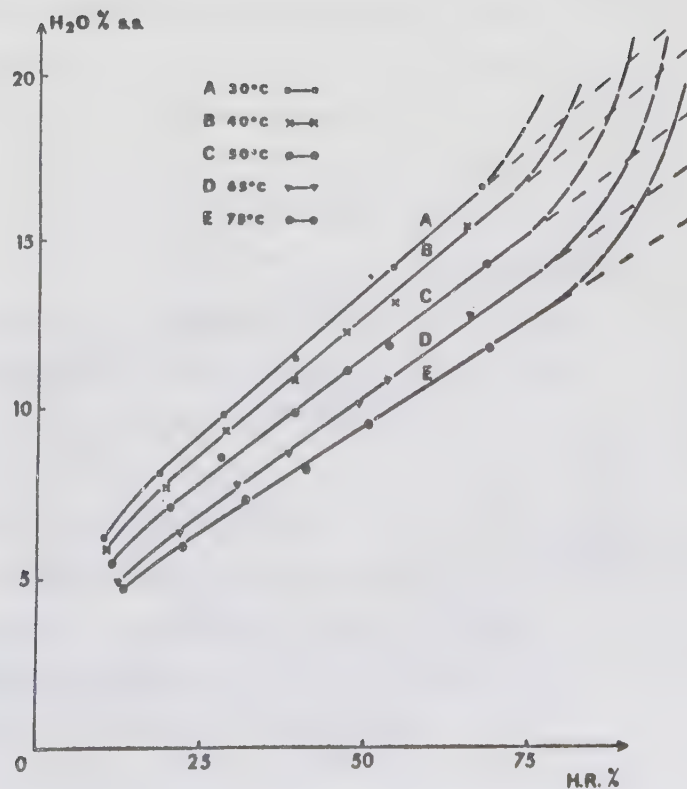


Figure 21 - Isothermes de sorption de vapeur d'eau du blé Cappelle établies à 30 et 80°C à l'aide de la méthode 1.

Figure 22 - Isothermes de désorption de vapeur d'eau du blé Cappelle établies à 5 températures, avec la méthode 1. Dans cet essai, l'échantillon de blé, à une H.R.E. déterminée, était successivement placé à 5 températures croissantes.



II - CHOCS THERMIQUES APPLIQUES A LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE.

A. RIBONUCLEASE PANCREATIQUE EN SOLUTION.

Afin de mieux préciser les conditions de pH dans lesquelles se déroulent les essais de chocs thermiques effectués sur une solution de RNase pancréatique, quelques essais préliminaires ont été faits sur l'influence de la température sur le pH de la solution. Il s'avère que le pH de la solution aqueuse de RNase (4,5 environ) ne varie pratiquement pas au cours du chauffage de la solution, et ce, jusqu'à 100°C au moins ; par contre, au cours du refroidissement, il tend à augmenter (tableau 8).

Tableau 8 - Evolution du pH de la solution de RNase pancréatique et du tampon acétate en fonction de la température (la correction de température du pH-mètre ayant été effectuée).

Température en °C		20	25	30	40	50	60	70	80	90	95	100
pH solution aqueuse de la RNase	au chauffage	4,55	4,55	4,50	4,35	4,30	4,40	4,40	4,50	4,55		4,60
	au refroidissement	6,75					6,45	6,40	6,10	5,70	5,60	
pH de la solution tampon au cours du chauffage		4,50			4,15		3,95		3,80			3,80

Le tampon acide acétique-acétate à pH 4,5, chauffé dans les mêmes conditions, présente au chauffage une variation de pH supérieure à celle de la solution aqueuse de RNase (tableau 8) ; par contre, il revient évidemment à son pH initial au refroidissement.

Dans ces conditions, il nous est apparu plus logique de procéder à un essai de dénaturation en solution aqueuse, non tamponnée ; on évite ainsi toute possibilité d'un effet quelconque dû à la présence d'ions étrangers dans la solution.

1- Essais de choc thermique appliqué à une solution de ribonucléase (type III) à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

L'étude porte sur les effets d'un choc thermique, en fonction de la température, sur l'activité de la solution. Les résultats, exprimés comme précédemment, sont présentés sur la figure 23 : on retrouve l'allure caractéristique déjà décrite, avec deux phases linéaires successives.

2 - Essais de choc thermique appliqué à une solution de RNase (type III) en fonction de la concentration.

Afin d'apprécier l'effet éventuel de la concentration de la solution

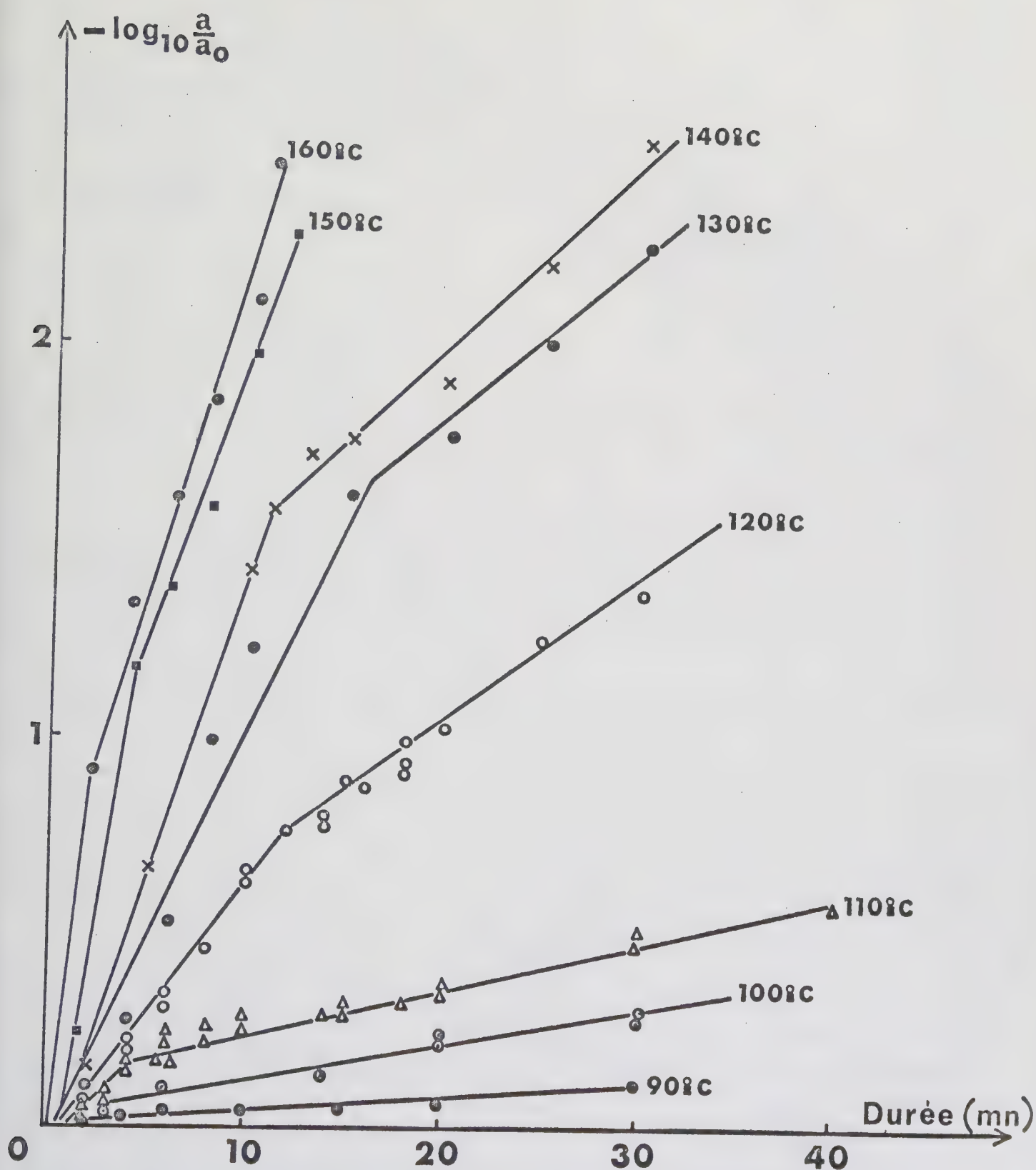


Figure 23 - Diminution relative de l'activité de la RN-ase pancréatique type III en solution ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à diverses températures, (activité initiale dans les conditions standards du dosage : $a_0 = 1,050$).

sur la forme de la cinétique, deux essais de dénaturation ont été conduits respectivement à 110 et 120°C sur une solution à 1 mg/cm³, soit 200 fois plus concentrée que la solution habituelle à 5 µg/cm³. On constate dans le premier cas la présence des deux phases dénaturantes ; dans le second cas, l'essai n'a pas été poursuivi assez longtemps pour faire apparaître cette seconde phase ; cependant, on voit que la proportion de RNase dénaturée au cours de la première phase est beaucoup plus grande dans le cas de la solution concentrée. (fig. 24).

3- Essais sur l'influence du degré de pureté de la RNase pancréatique sur la cinétique de dénaturation.

Le même traitement thermique a été appliqué à la RNase type III et à la RNase type IV. Dans les deux cas, on retrouve les deux phases linéaires successives, mais l'effet dénaturant de la première phase est beaucoup plus intense dans le cas de la RNase la plus pure : en effet, dans ce cas, 72 p.100 de l'activité de la RNase sont perdus au cours de la 1ère phase, contre 35 p.100 dans l'autre cas.

B. RIBONUCEASE SOLIDE A DIFFERENTS TAUX D'HYDRATATION.

Afin d'en comparer les résultats à ceux obtenus in situ avec la ribonucléase de blé, une série de chocs thermiques a été effectuée sur la RNase pancréatique solide aux teneurs en eau et aux températures indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9 - Chocs thermiques sur la RNase solide : températures étudiées en fonction de la teneur en eau.

Humidité relative p.100 à 30°C	0	21,6	52,3	88	95,5
Teneur en eau p.100 s.s. appréciée d'après la courbe de sorption à 30°C	0	6	11	22	40 à 50
Température °C	160 165 175	96 110 120	100 120 130	70 85 100	90 110

Dans chaque cas, 5 à 10 durées d'action, allant de 2 à 100 minutes, ont été étudiées.

Ces résultats, malgré les difficultés d'ordre technique signalées dans le protocole expérimental ont permis de retrouver (fig. 25), avec l'existence de deux phases linéaires successives, une cinétique semblable à celle des autres essais.

La RNase pancréatique solide a pu être déshydratée de façon quasi totale, par un séjour de 24 heures dans un dessiccateur, sous vide

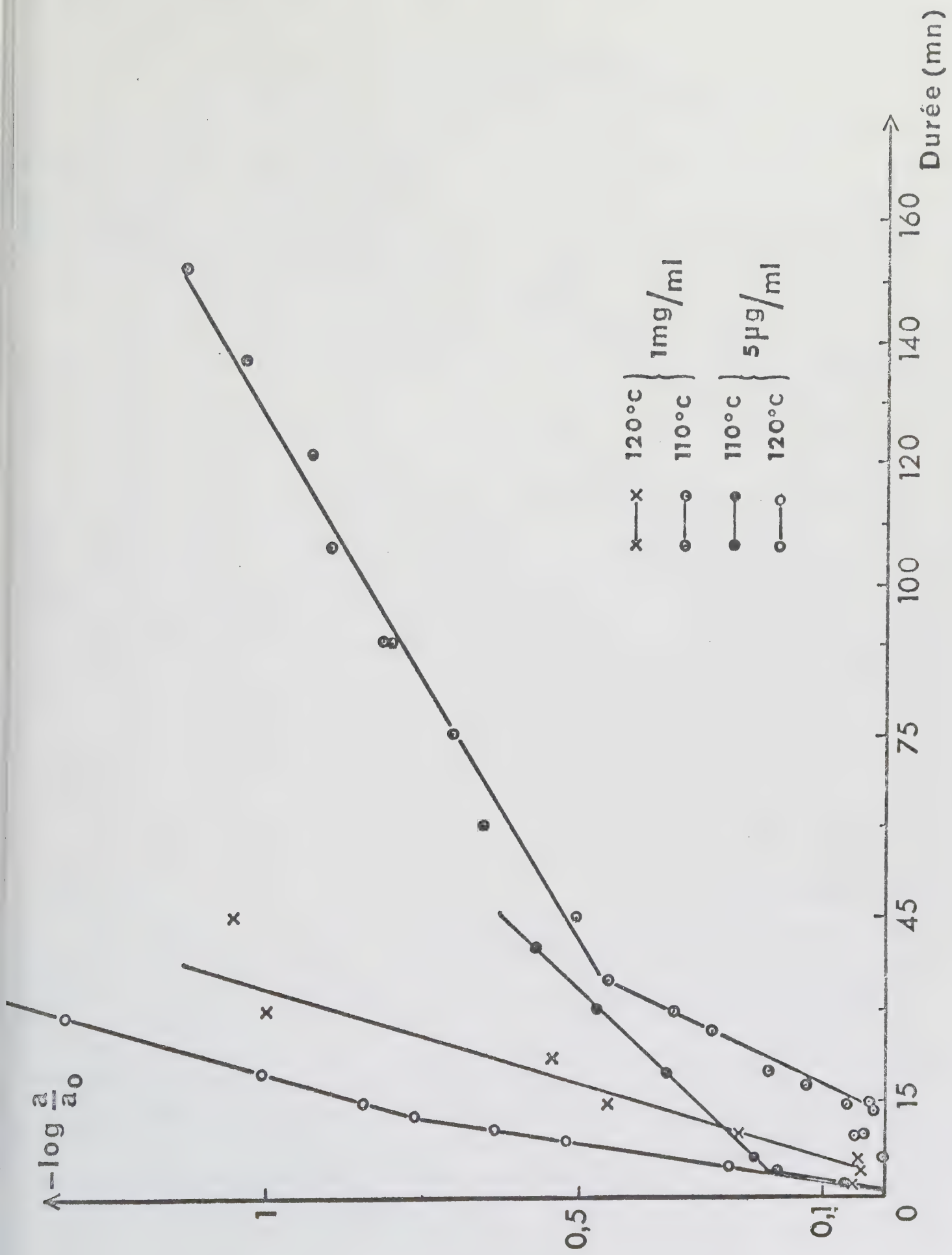


Figure 24 - Diminution relative de l'activité de la RN-ase pancréatique en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à deux températures pour des solutions de concentrations différentes

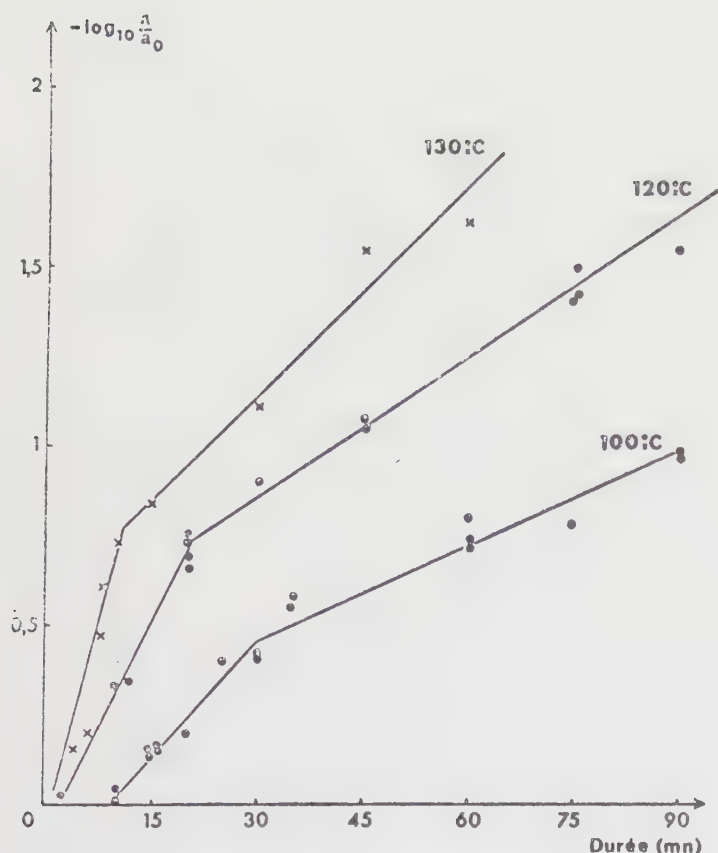
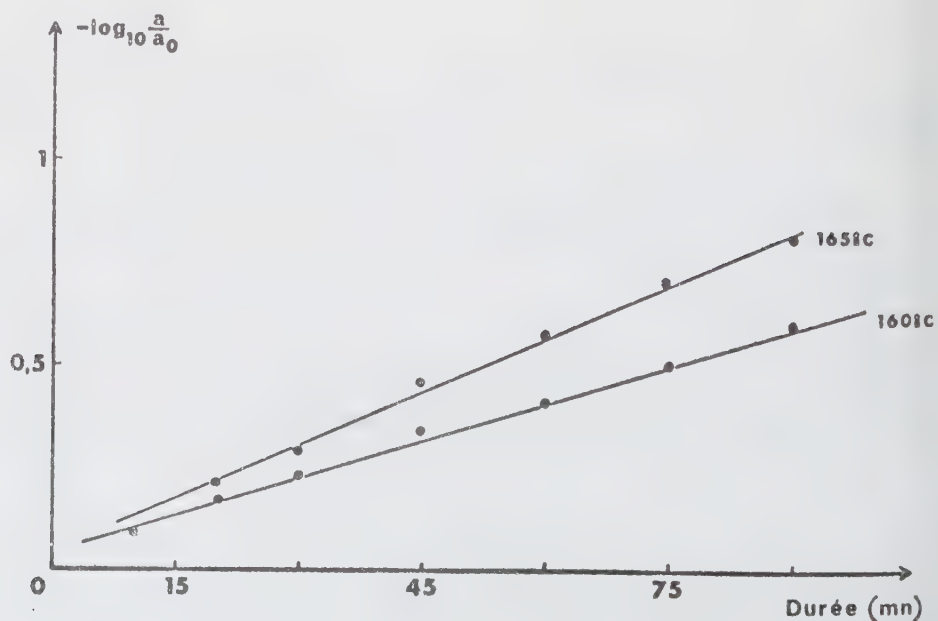


Figure 25 - Diminution relative de l'activité de la RNase pancréatique solide, hydratée à 11°/o S.S. (H.R.E. = 52,3°/o) en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante, à diverses températures.

Figure 26 - Diminution relative de l'activité de la RNase pancréatique solide, à l'état sec, en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à diverses températures.



(environ 20 mm Hg), en présence d'anhydride phosphorique et à température ambiante ; la RNase était ensuite manipulée dans la boîte à gants, en présence d'air déshydraté. Dans ces conditions, il n'y a eu aucun effet dénaturant au cours du séchage et le témoin déshydraté présente la même activité que la RNase normale.

Dans ce cas, on observe (fig. 26) une cinétique très différente : elle demeure linéaire dans le système de coordonnées choisi, mais semble présenter à toutes les températures une seule phase, ou tout au moins une première phase presque inexistante.

Seuls les essais correspondant aux H.R. de 0 et de 52,3 p.100 ont été traduits en graphiques ; les autres résultats sont consignés dans le tableau 10.

C. ETUDE DE SORPTION.

Nous avons établi la courbe de sorption de la ribonucléase type III, tant native que dénaturée (chocs thermiques à H.R.E. de 52 p.100 à 120°C, durant 15 à 60 minutes). Ces courbes sont présentées sur la figure 27. La courbe RNase native est celle-là même qui permet d'apprécier la teneur en eau des échantillons soumis au choc thermique.

On observe que les courbes correspondant aux échantillons dénaturés se trouvent au-dessous de celle de la RNase native : après dénaturation, la protéine présente moins d'affinité pour l'eau.

Il apparaît que la courbe de sorption de la RNase pancréatique native est très peu différente, pour une même température de celles généralement obtenues avec les protéines et en particulier avec le gluten du blé. Bien que nous n'ayons pu le vérifier, il y a donc lieu de penser que la même isotherme de sorption relative à la RNase du blé, est également très peu différente.

La courbe de sorption du blé, résultante additive pondérée de celles de l'amidon et du gluten, montre que pour une H.R.E. donnée, la teneur en eau des protéines et donc de la RNase, est légèrement inférieure à celle, moyenne, du blé entier.

En toute rigueur quand on explicitera certains aspects de la dénaturation en fonction de la teneur en eau, il conviendrait d'effectuer cette correction ; cependant celle-ci étant faible et ne modifiant en rien l'allure des phénomènes, nous la négligerons en première approximation en ne considérant que la teneur en eau moyenne du milieu subissant le choc thermique.

Tableau 10. - Activité RN-asiqne de la ribonuclease pancréatique après un choc thermique en milieu solide. (Les résultats relatifs aux teneurs en eau 0°/o et 52°/o, représentés sur les figures 25 et 26 ne sont pas reproduits ici).

Humidité relative °/o mesurée à 30°C	Teneur en eau °/o (*) s.s.	Température °C	Durée minutes	Activité RN-asiqne a (**)	Activité résiduelle a/a_0 $a_0 = 0,950$	$-\log_{10} \frac{a}{a_0}$
21,6	6	96	5-10-15-20	0,950	1,000	0,000
			30	0,906	0,954	0,020
			60	0,475	0,501	0,300
			96	0,232	0,245	0,610
		110	20	0,906	0,954	0,020
			30	0,300	0,316	0,500
			45	0,189 - 0,150	0,199 - 0,158	0,700 - 0,800
			60	0,133 - 0,111	0,141 - 0,117	0,850 - 0,930
			75	0,084	0,089	1,050
			90	0,041	0,044	1,350
		120	10	0,906	0,954	0,020
			20	0,378	0,398	0,400
			30	0,116	0,123	0,910
			45	0,075	0,079	1,100
			60	0,047	0,050	1,300
			75	0,026	0,028	1,550
			95	0,0085	0,009	2,000

(*) Teneur en eau appréciée à partir de la mesure à 30°C de l'humidité relative, grâce à la courbe de sorption (figure 27) établie à la même température.

(**) L'activité est exprimée en densité optique telle qu'elle est obtenue dans les conditions standard du dosage (cf. Méthodes) avec en particulier, une dilution finale du surnageant de 1 à 15.
L'activité a_0 du témoin non traité s'est maintenue à une valeur constante $a_0 = 0,950$.

Tableau 10. - (suite)

Humidité relative °/° mesurée 30°C	Teneur en eau °/° (*) s.s.	Tempé- rature °C	Durée minutes	Activité RN-asique a (**)	Activité résiduelle a/a ₀ a ₀ = 0,950	- log ₁₀ $\frac{a}{a_0}$
88	22	70	15	0,886	0,933	0,030
			20	0,737	0,776	0,110
			30	0,533	0,562	0,250
			60	0,336	0,354	0,450
			90	0,211	0,223	0,650
		85	10	0,886	0,933	0,030
			15	0,737	0,776	0,110
			30	0,464	0,489	0,310
			60	0,222	0,234	0,630
			90	0,103	0,109	0,960
		100	5	0,754	0,794	0,100
			10	0,642	0,676	0,170
			15	0,571	0,602	0,220
			30	0,321	0,338	0,470
			90	0,076	0,081	1,090
5,5	40 à 50	90	10	0,896	0,944	0,025
			20	0,875	0,922	0,035
			30	0,808	0,851	0,070
			45	0,771	0,812	0,090
			60	0,711	0,749	0,125
			75	0,656	0,691	0,160
			90	0,578	0,609	0,215
		110	10	0,414	0,436	0,360
			20	0,108	0,114	0,940
			30	0,041	0,044	1,350
			45	0,020	0,022	1,650
			60	0,0085	0,009	2,000
			75	0,0057	0,006	2,220
			90	0,0019	0,002	2,550

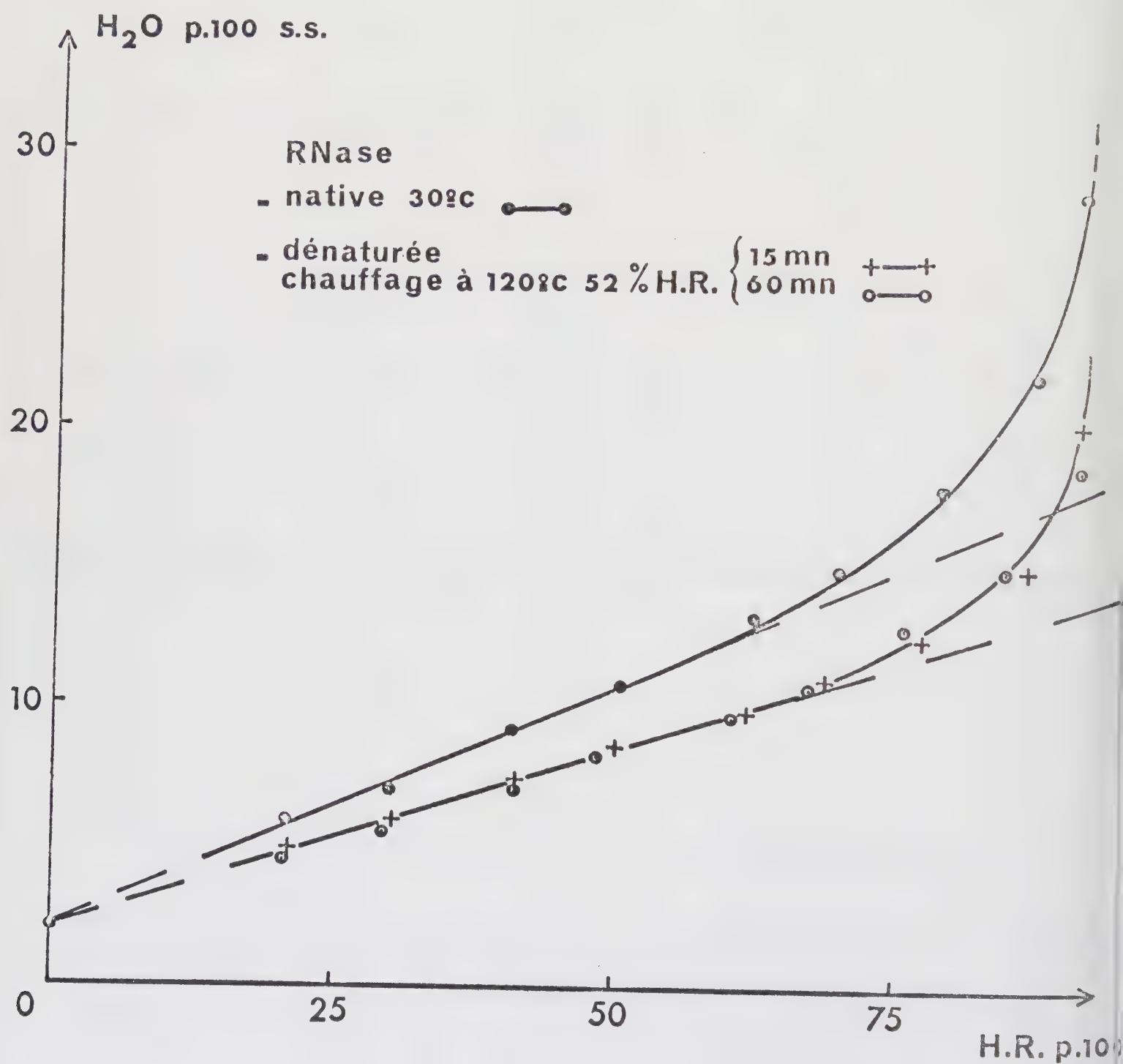


Figure 27 - Isothermes de sorption de vapeur d'eau pour la RN-ase pancréatique native et dénaturée après un choc thermique effectué à 120°C, à une teneur en eau de 11%, pendant 15 et 60 minutes, (valeurs établies par la méthode 2, à 30°C).

D. DOSAGE DES GROUPEMENTS SH LIBRES ET DES PONTS S-S

Après avoir vérifié que l'on trouve avec la méthode utilisée quatre ponts disulfures et aucun SH libre dans la RNase native, on a mesuré, en fonction du temps, la quantité de SH libres se formant au cours d'un choc thermique. L'échantillon choisi est celui conditionné à 52 p.100 d'humidité relative, et choqué à 120°C. Les résultats, exprimés en nombre de SH libres par gramme et par mole de RNase (en prenant comme poids moléculaire la valeur moyenne de 14 000) sont donnés dans le tableau 11.

TABEAU 11 - Evolution du nombre de groupements SH libres dans la RNase solide, en fonction de la durée d'un choc thermique effectué à 120°C et à une teneur en eau de 11 p.100.

Durée de choc (minutes)		0 (témoin)	5	15	16	60	80
Nombre de SH libres	10^{-6} par g	0	10,0	7,2	5,4	0	0
	par mole	0	0,140	0,100	0,075	0	0

Il semble donc y avoir, au tout début de la dénaturation, une libération brutale de groupements SH libres, suivie d'une diminution plus lente du nombre de ceux-ci.

CHAPITRE IV - INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION GENERALE

Les résultats présentés dans le chapitre précédent nous ont permis de dégager certaines interprétations que nous allons exposer et discuter plus en détail.

I - CINETIQUE DE LA REACTION.

Les valeurs expérimentales correspondant aux activités enzymatiques et aux temps moyens de germination, sont exprimées respectivement sous la forme du logarithme du rapport $\frac{a}{a_0}$ et $\frac{T_m}{T_{m_0}}$. Après avoir justifié le choix de ce mode d'expression et l'hypothèse de travail retenue, la signification de la cinétique observée sera discutée.

A. JUSTIFICATION DU MODELE CINETIQUE CHOISI.

1°) Justification du mode d'expression.

a) Type de réaction étudié.

Les résultats obtenus au cours de ce travail procèdent de chocs thermiques effectués à teneur en eau constante et s'expriment par une perte d'activité enzymatique ou par une perte de viabilité du grain de blé.

- L'inactivation thermique de la ribonucléase - tant celle extraite du blé, que celle d'origine pancréatique - traduit en fait la dénaturation de la protéine. Cette dénaturation est irréversible dans nos conditions expérimentales ; elle correspond à des modifications structurales assez profondes, en tout état de cause plus importantes que la seule modification de structure secondaire avec passage de l' α -hélice à la pelote statistique. Cette dernière provoque, à des températures beaucoup moins élevées d'ailleurs, les modifications du spectre U.V. ou de la rotation optique de la solution de ribonucléase, que décrivent, par exemple, HERMANS et SHERAGA, (1961) ; BRANDTS, (1965) ; KLOTS, (1967). La dénaturation thermique qui nous intéresse ici est proche de celle décelée par l'insolubilisation de la protéine (NORTHROP, 1932 et HARRIS, 1956).

- La viabilité d'un grain (définie comme l'aptitude à germer) est fonction en particulier du bon fonctionnement des systèmes enzymatiques, de l'intégrité des A.R.N. et A.D.N. responsables de la synthèse des protéines et des protéines elles mêmes ; on peut donc estimer qu'une mesure de la viabilité qui intègre ces différentes altérations constitue un bon critère général de la dénaturation. Certains résultats obtenus avec la mesure du pouvoir germinatif en fonction du chauffage (HUTCHINSON, 1944 ; GEDDES 1929, 1930) et nos propres essais confirment ce point de vue.

b) Hypothèse de travail choisie.

Dans ces conditions et bien que la réalité soit plus complexe, nous avons admis à priori comme hypothèse de travail que la dénaturation des protéines est une réaction de type monomoléculaire, dont l'ordre apparent est égal à 1 (JOLY, 1965 ; DUCHESNE, 1964). L'intégration classique de l'équation $v = \frac{dc}{dt} = kc$ représentant la vitesse de réaction, conduit à $\text{Log} \frac{c}{c_0} = kt$, ou encore $\log_{10} \frac{c}{c_0} = \frac{k}{2,3} t$, système dans lequel ont été exprimés les résultats obtenus.

Dans le cas de l'activité ribonucléasique $\frac{c}{c_0}$ est égal à $\frac{a}{a_0}$, activité après traitement rapportée à l'activité du témoin. Il convient de noter que ce rapport sans dimension est celui des densités optiques obtenues après l'arrêt de la réaction enzymatique ; ceci est justifié du fait que :

- la loi de BEER étant vérifiée, la densité optique mesurée est proportionnelle à la quantité de produit libéré par la réaction (oligonucléotides acido-solubles) ;
- la quantité de produits libérés au cours de la réaction est proportionnelle au temps ; par conséquent l'activité qui s'identifie à la vitesse initiale de réaction est considérée comme égale à la quantité de produit formé au bout d'un temps donné (20 minutes) ;
- enfin, l'activité mesurée, au moins avant le choc thermique dans le cas du blé, est proportionnelle à la concentration en enzymes du milieu : ce rapport des activités est donc égal au rapport des concentrations enzymatiques.

Dans le cas de la germination*, $\frac{c}{c_0}$ est considéré égal à $\frac{T_m}{T_{m_0}}$, temps moyen de germination du blé traité rapporté à celui du blé témoin non traité, ce qui postule que ce temps moyen est inversement proportionnel aux concentrations moyennes des systèmes inactivés ; ceci ne peut, dans l'état actuel de nos travaux, être démontré ; cependant, l'ensemble des résultats obtenus, en particulier du point de vue cinétique et thermodynamique, est en accord avec cette hypothèse.

Les résultats, présentés selon l'équation d'une réaction d'ordre 1, font apparaître dans le cas de la ribonucléase aussi bien que dans celui du temps moyen de germination, deux phases linéaires successives, souvent précédées d'une phase de latence plus ou moins importante ; il paraît dès lors logique d'admettre l'existence de deux réactions, ou de deux mécanismes réactionnels successifs dans la dénaturation des protéines,

* L'aspect un peu particulier que constitue l'évolution de la variance de la distribution en fonction du traitement, aspect qui n'est pas lié directement à la dénaturation, est traité en annexe.

hypothèse déjà proposée par différents chercheurs.

Le mode d'expression choisi étant ainsi justifié, le modèle cinétique utilisé va être maintenant discuté.

2°) Justification de l'hypothèse choisie.

Il est difficile d'affirmer que les courbes obtenues présentent une linéarité stricte ; il se pourrait que l'on soit en présence d'arcs de courbes très tendus, assimilables en première approximation à une droite dans un certain intervalle. Problème assez difficile que l'on ne peut résoudre que par une voie statistique exigeant de nombreuses reproductions des mêmes essais et par conséquent peu applicable dans cette étude. Il a cependant été possible de réaliser ce test de linéarité dans un cas précis et limité : celui du choc thermique à 110°C sur une solution de ribonucléase pancréatique type III à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Il s'est avéré que :

- pour la première phase, cette hypothèse ne peut être retenue en toute sécurité : elle est rejetée au seuil 5 p.100, mais ne l'est pas au seuil 2,5 p.100 ; on peut supposer dans ce cas que le test manque de puissance faute d'un nombre suffisant d'essais ; par ailleurs, la longueur de courbe utilisable pour ce test est très courte, compte tenu des parties curvilignes situées au début de cette première phase et au niveau de son passage progressif à la deuxième phase.
- pour la deuxième phase, l'hypothèse de linéarité est admissible dans le domaine étudié (à 5 p.100).

Ces résultats sont confirmés par la détermination de l'ordre de la réaction par la méthode différentielle de VAN'T HOFF (EMSCHWILLER, 1951) ; elle consiste à porter $\log v$ en fonction de $\log c$, v étant la vitesse de la réaction ($v = \frac{dc}{dt}$) et c la concentration d'un réactant ; les figures 29 et 30 montrent le résultat obtenu dans le cas du choc à 58°C avec le blé à 35 p.100 H_2O . Il apparaît, tant dans le cas de la germination que dans celui de la RNase, que la relation est linéaire dans la zone correspondant à la deuxième phase, la pente de la droite obtenue correspondant sensiblement à une réaction d'ordre 1 ; par contre, pour les durées relatives à la première phase, on observe une courbe passant par un maximum, traduisant une réaction complexe n'ayant pas d'ordre. D'ailleurs la représentation parfois utilisée de la dénaturation selon une réaction d'ordre 2 (fig. 28) aboutit également à la distinction de deux stades dont la représentation n'est pas plus satisfaisante que celle d'ordre 1.

D'un tout autre point de vue, l'existence de deux phases distinctes apparaît également si l'on considère le pourcentage résiduel d'activité comme étant la fréquence de la distribution des durées de vie des molécules enzymatiques ; en portant ces pourcentages sur une échelle d'anamorphose,

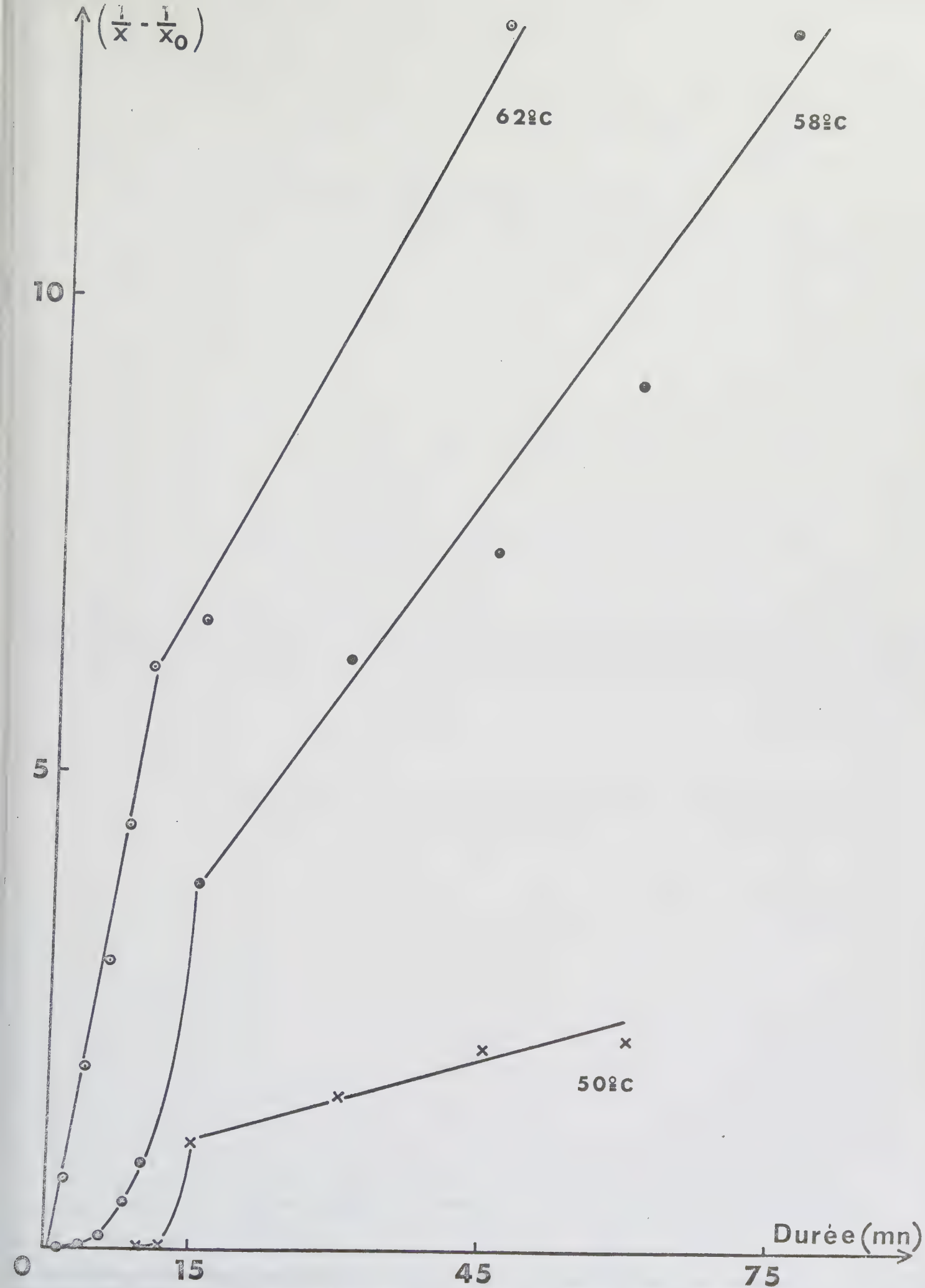


Figure 28 - Diminution relative de l'activité de la RN-ase extractible du blé hydraté à 35%, en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante à diverses températures. Représentation dans l'hypothèse d'une action de 2^{ème} ordre.

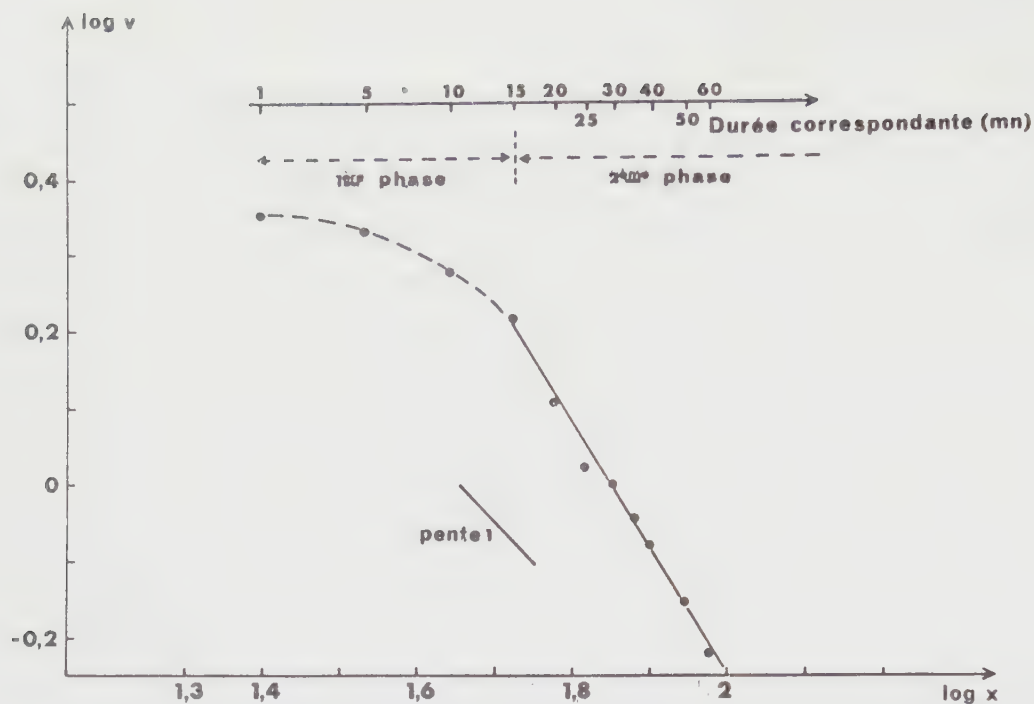


Figure 29 - Exemple de recherche de l'ordre de la réaction selon la méthode différentielle de VANT'HOFF dans le cas de l'évolution du Temps moyen de germination à la suite d'un choc thermique conduit à 58°C sur du blé hydraté à 35%. (v = vitesse de la réaction ; x = Temps moyen correspondant).

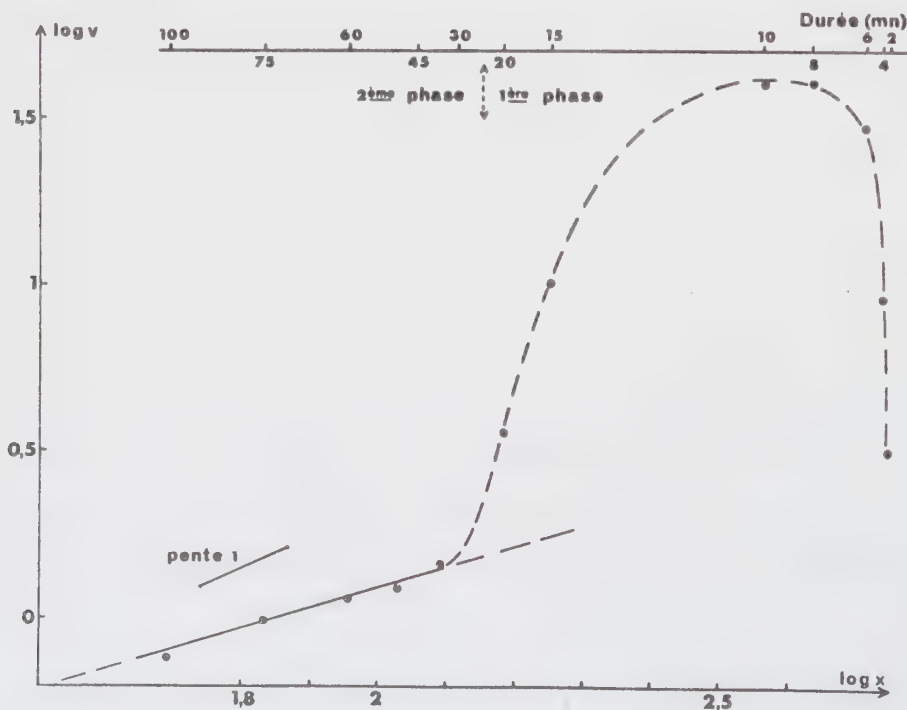


Figure 30 - Exemple de recherche de l'ordre de la réaction selon la méthode différentielle de VANT'HOFF dans le cas de l'évolution de l'activité RNasique à la suite d'un choc thermique conduit à 58°C sur le blé hydraté à 35%. (v = vitesse de réaction, x , activité enzymatique correspondante).

avec en abscisse le logarithme de la durée de traitement (fig. 31), on observe deux segments de droites ; ceux-ci indiquent la présence de deux populations gaussiennes distinctes : l'une se dénaturant vite, l'autre se dénaturant lentement.

L'ensemble de ces observations permet donc de conclure que l'allure de la cinétique de dénaturation en milieu solide peu hydraté présente les caractéristiques suivantes :

- une phase de latence, en général très courte, au cours de laquelle aucune dénaturation ne se manifeste ;
- deux phases bien distinctes dans la dénaturation, la première étant beaucoup plus rapide que la seconde.
- la deuxième phase est d'ordre 1 ; la première phase par contre n'a peut-être pas d'ordre, bien que, sa représentation dans le système $\text{Log } \frac{c}{c_0} = f(t)$ semble linéaire.

Compte tenu, d'une part, de ce que aucun autre modèle cinétique n'offre une meilleure représentation graphique et d'autre part, de ce que les interprétations et analyses que permet le modèle proposé sont les plus intéressantes, nous considérons qu'il y a dans tous les cas deux phases dénaturantes successives correspondant chacune à des réactions du premier ordre. Toutes les discussions qui suivent reposent sur cette hypothèse.

B. ETUDE DE QUELQUES FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LA CINETIQUE DE DENATURATION.

Un certain nombre de facteurs -- pureté, concentration, température, teneur en eau, pH -- peuvent modifier soit l'allure de la cinétique, soit l'ordre de la réaction.

Le facteur pH n'est pas étudié dans ce travail dont le but essentiel est de dégager les caractéristiques de la dénaturation en milieu solide : or, dans ces milieux, la notion de pH ne peut être définie.

1°) Facteur pureté.

Les résultats obtenus dans le cas du blé sont relatifs à un milieu biochimique complexe ; l'une des méthodes choisies (RNase extractible) fait appel à un composant particulier, l'autre (T_m) donne une idée globale de l'état de dénaturation du blé. Il était intéressant de voir si les cinétiques obtenues dans ces conditions ont une allure comparable à celles relatives à un milieu pur solide. Les expériences effectuées avec la RNase pancréatique solide fournissent déjà une réponse positive. Afin de la rendre plus générale, les essais de dénaturation thermique en milieu liquide ont été conduits sur deux types de RNase pancréatique de pureté différente. (RNase type III et IV).

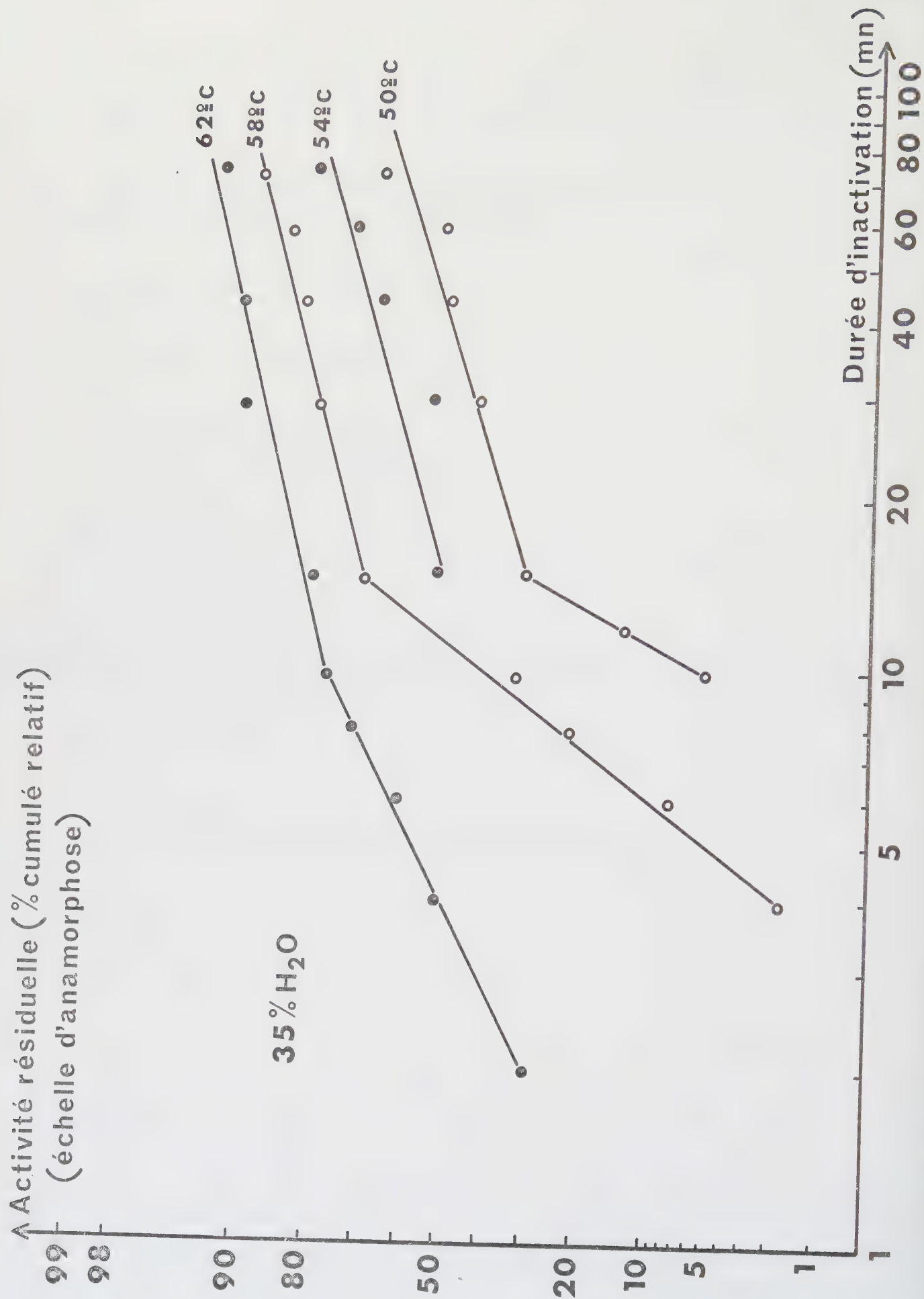


Figure 31 - Diminution relative de l'activité de la RN-ase extractible du blé, hydraté à 35%, S.S., en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante, à diverses températures. Représentation de la distribution de fréquence cumulée des durées de vie des molécules enzymatiques.

Ces divers essais montrent que la forme de la cinétique à deux phases successives, n'est pas modifiée par le degré de pureté de la protéine au moment du traitement thermique. L'ordre de la réaction ne semble pas non plus changer, au moins dans nos conditions expérimentales.

Par contre, l'entourage biochimique et le degré de purification modifient profondément les vitesses de dénaturation et les pourcentages dénaturés respectivement au cours de la première et de la deuxième phase de la réaction.

2°) Facteur concentration.

L'étude de ce facteur concerne la dénaturation des protéines en solution ; l'observation, faite par GAJEWSKA et SHUGAR (1955), de la présence d'une ou de deux phases linéaires au cours de la dénaturation de la RNase en solution selon la concentration de celle-ci, risquait de compromettre certaines de nos hypothèses.

Nous avons montré (fig. 24) que la concentration, comme la pureté des protéines, ne modifie pas le nombre des phases, mais change par contre l'importance relative de celles-ci. Il apparaît en effet qu'avec une concentration de $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, par rapport à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, à la même température de 110°C la phase de latence est plus longue, la durée de la première phase est accrue (20 minutes au lieu de 5) et son effet dénaturant beaucoup plus élevé (65 p.100 de l'activité disparus en fin de 1ère phase, contre 35 p.100 environ).

Le résultat contradictoire de GAJEWSKA et SHUGAR s'explique aisément; les auteurs n'ont pas procédé à des traitements d'une durée suffisante : ainsi, aux fortes concentrations, la seconde phase de la réaction n'a pas été mise en évidence.

3°) Facteurs température et teneur en eau.

Les facteurs température et surtout teneur en eau sont les plus intéressants en milieu solide. Ils semblent jouer sur la forme de la cinétique un rôle non négligeable, mais difficile à analyser.

a) Teneur en eau.

La cinétique de dénaturation de la RNase pancréatique déshydratée semble montrer une seule phase linéaire, ou tout au moins une première phase extrêmement réduite, l'imprécision des résultats obtenus dans ce cas ne permettant pas d'aboutir à une certitude sur ce point. Cependant, par analogie avec les autres essais, la pente des droites obtenues, les durées impliquées, la valeur des paramètres thermodynamiques, tout concourt à indiquer que la phase observée est analogue à la deuxième phase des réactions étudiées en présence d'eau.

Ces remarques jointes à une observation analogue faite par POWELL (1964) montrent déjà le rôle essentiel que l'eau doit jouer dans ces mécanismes de dénaturation.

b) Température.

Dans certaines expériences, nous avons observé pour une teneur en eau donnée la disparition pratiquement complète d'une des deux phases à une température assez basse correspondant à une vitesse de dénaturation très faible. Il en est ainsi par exemple avec la RNase pancréatique (6 p.100 - 96°C et 22 p.100 - 90°C), et la RNase du blé (4,5 p.100 - 125°C, 22 p.100 - 68°C et 45 p.100 - 40°C).

Même en présence de deux phases, la température joue un rôle très important sur la durée de la première phase et sur le pourcentage d'enzymes inactivés au cours de celle-ci.

Dans le cas de la RNase pancréatique en solution ($5^{\circ}\mu\text{g}/\text{cm}^3$) ceci est particulièrement net ; en effet, on constate que les points de passage de la première à la deuxième phase se situent sur une courbe elliptique très allongée dont les foyers ont été déterminés graphiquement. (Fig. 32).

Pour chacun de ces points de passage, nous avons porté, en fonction de la température, d'une part, le pourcentage d'activité résiduelle en fin de première phase, d'autre part, la durée cumulée de la première phase et de la phase de latence (cette dernière étant pratiquement nulle dans le cas de la solution).

On constate sur la figure 33 que pour une température voisine de 130°C, d'une part, le pourcentage d'activité résiduelle est minimal, d'autre part, la durée de la première phase est maximale. Ce qui revient à dire qu'à cette température, l'efficacité "dénaturante" de la première phase est maximale.

Dans le cas du blé (essai à la teneur en eau de 35 p.100) la durée de la seule première phase passe par un maximum en fonction de la température. Cependant, ce maximum ne correspond plus à une efficacité optimale de la première phase, cette efficacité étant croissante avec la température.

Dans les autres essais, les résultats ne sont pas assez nombreux pour dégager une relation, mais tout laisse à penser qu'il existe une température d'efficacité maximale, variant naturellement avec l'hydratation.

Dans toutes les expériences en milieu solide (sauf pour la RNase pancréatique déshydratée), nous avons observé une phase de latence, qui précède la première phase de dénaturation et pendant laquelle il ne semble y avoir aucun effet décelable. La durée de cette phase de latence, au moins dans certains cas, est nettement plus longue que la durée de la mise en équilibre thermique : en effet l'équilibre thermique dure au plus 3 minutes (cf page 8) dans le blé, alors que par exemple dans l'expérience

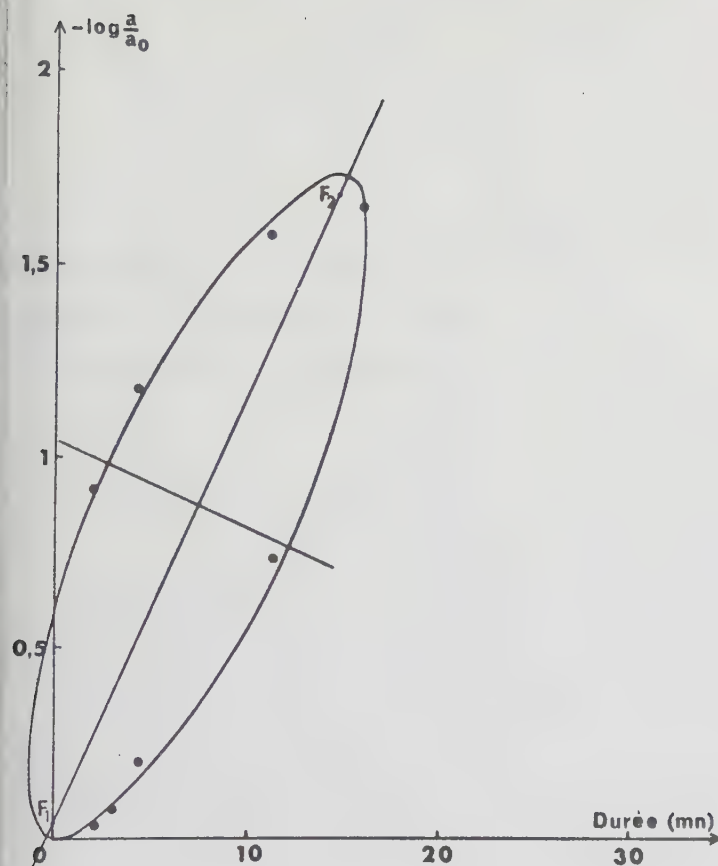
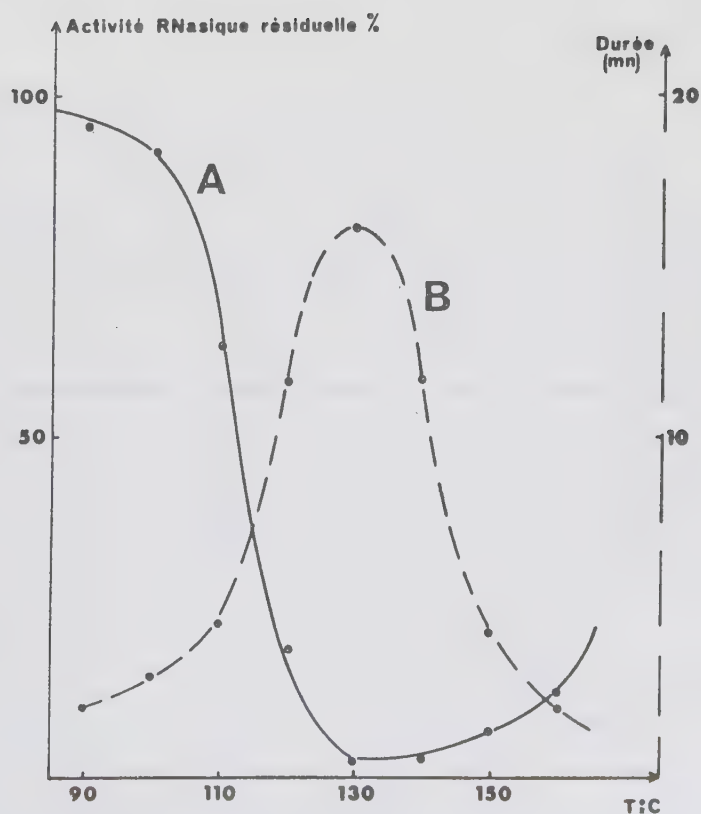


Figure 32 - Courbe elliptique lieu des points de contact entre la 1ère et la 2ème phase de la réaction représentant la perte relative d'activité, en fonction du temps, de la RN-ase pancréatique en solution. ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

Figure 33 - Evolution en fonction de la température du choc thermique, d'une part du pourcentage d'activité résiduelle en fin de 1ère phase (A), et d'autre part des durées cumulées de la phase de latence et de la 2ème phase (B).



à la teneur en eau de 35 p.100, la phase de latence atteint 10 à 15 minutes. La durée de cette phase apparaît comme une fonction décroissante de la température (Fig. 18). Nous verrons plus loin l'interprétation que l'on peut donner de ces phénomènes.

C. RELATION ENTRE L'EVOLUTION DE LA DENATURATION ET LA MODIFICATION DE L'ETAT DE LIAISON DE L'EAU DANS LE SYSTEME.

1°) Variation de l'H.R.E. pendant le choc thermique.

Les différences observées dans les températures et les vitesses de dénaturation en fonction de la teneur en eau du milieu semblent indiquer que l'eau et son état de liaison jouent un rôle essentiel dans le mécanisme de la dénaturation en milieu solide.

L'étude critique du protocole expérimental comporte l'analyse des transformations se produisant dans l'état de liaison de l'eau quand on chauffe une substance solide à teneur en eau constante.

Dans le tableau 12 ces deux aspects -durées des divers phénomènes impliqués lors du chauffage, évolution de l'H.R.E. d'une part, dénaturation d'autre part- sont confrontés. Bien qu'il n'ait pas été possible pour des raisons techniques, de réaliser les deux séries de mesures exactement aux mêmes températures et aux mêmes teneurs en eau, un certain nombre de remarques se dégagent de cette confrontation.

Tableau 12 - Comparaison des durées relatives aux phases de dénaturation de la RNase de blé et des variations simultanées d'humidités relatives. Les valeurs d'H.R. mesurées avec l'hygromètre Sina, sont reprises du tableau 5.

Dénaturation de la RNase du blé					Variations d'humidité relative correspondantes			
Teneur en eau (%) 1	Température (°C) 2	Durée phase latence (mn) 3	Durée 1ère phase (mn) 4	Somme de 3 et 4 (mn) 5	Teneur en eau (%) 6	Température (°C) 7	t ₁ (mn) 8	t ₂ (mn) 9
14	86	3	10 - 11	13 - 14	16	50	3	20
	90	2	14 - 15	16 - 17		90	2	16
22	74	1	16	17	21	60	1,5	14
						70	1,5	11
35	56	5	16	21	31	60	2,5	14 - 15
	62	0	10	10				

Tout d'abord, la comparaison des colonnes 3 et 8 du tableau montre que la durée de la phase de latence correspond au laps de temps (t_1) nécessaire pour que la désorption de vapeur d'eau du grain sous l'influence de la température devienne sensible sur l'enregistrement hygrométrique.

Tout se passe comme si la dénaturation ne commençait que lorsqu'est apparue une certaine modification de l'état de liaison de l'eau dans le produit sous l'effet de la chaleur ; du reste la durée t_1 est du même ordre de grandeur que celle de la mise en équilibre thermique du grain.

Bien que la durée nécessaire à l'équilibre de l'H.R. soit difficile à mesurer avec précision en raison de l'allure asymptotique de la courbe (fig. 34), la comparaison des colonnes 5 et 9 montre que cette durée est du même ordre de grandeur que la somme des durées de la phase de latence et de la première phase de dénaturation.

La deuxième phase de dénaturation commence lorsque le nouvel équilibre hydrique est atteint. La correspondance entre les durées de ces divers phénomènes n'est sûrement pas fortuite ; il apparaît ainsi que l'allure cinétique de la dénaturation, avec une phase de latence, et deux phases dénaturantes, est liée à l'évolution de l'état de liaison de l'eau dans la protéine, que traduit l'évolution de l'H.R.E.

L'existence d'une évolution analogue dans le cas de protéines en solution n'est d'ailleurs pas contradictoire ; en effet, d'une part l'équilibre thermique quasi instantané explique la disparition de la phase de latence ; d'autre part, et ceci a été montré par diverses méthodes (YON, 1969), la protéine en solution ou à l'état solide présente toujours la même proportion de molécules d'eau adsorbées à sa surface.

Lorsque toutes choses égales, par ailleurs, la température ou la teneur en eau du milieu augmente, la durée et l'importance de la modification de l'état de liaison de l'eau vont en croissant ; on doit donc s'attendre à ce que la durée et l'efficacité de la dénaturation de la 1ère phase, liées à ce phénomène aillent en augmentant. De même, la durée du transfert de chaleur diminuant (l'augmentation de la température entraîne un gradient plus élevé, celle de la teneur en eau facilite le phénomène de convection), la durée de la phase de latence doit diminuer.

On constate sur les figures 17, 23 et 26 qu'il en est bien ainsi, au moins jusqu'à des valeurs de l'ordre de 80 à 120°C pour la température et de 40 p.100 pour l'hydratation. Au-delà, un effet inverse semble se produire, sans qu'une explication claire puisse en être donnée.

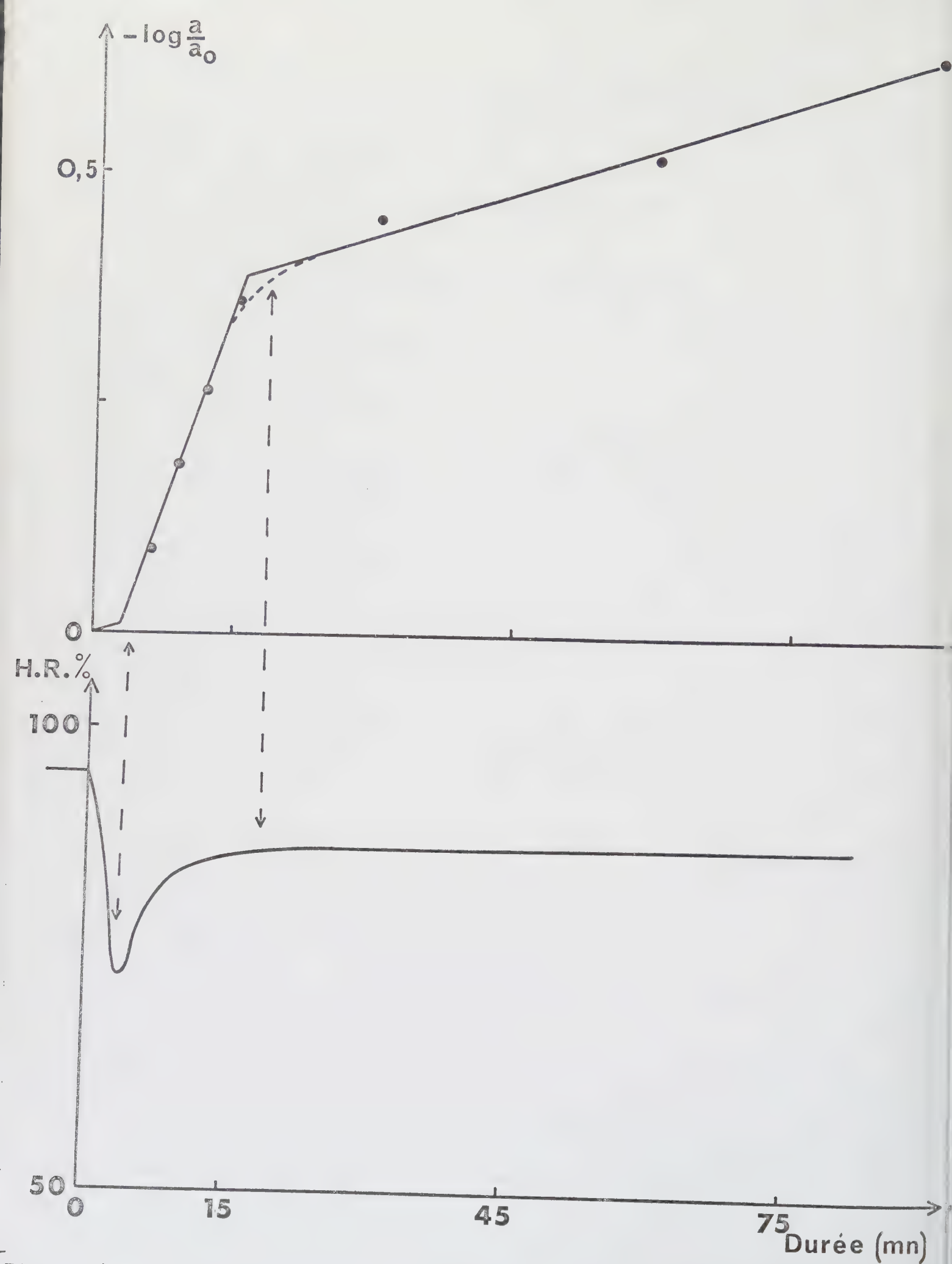


Figure 34 - Evolution comparée, en fonction du temps, de l'activité RN-résiduelle du blé, et de son H.R.E. enregistrée à l'aide de l'hygromètre SINA, au cours de chocs thermiques réalisés à 62°C sur du blé hydraté à 30%.

2°) Interprétation des phénomènes observés selon le schéma cinétique à deux étapes. d'ELEY et de LESLIE, (1964).

Ces auteurs donnent une interprétation intéressante de la cinétique de sorption-désorption dans le cas des protéines, selon laquelle le phénomène se produirait en deux étapes : le passage de la protéine et de l'eau libre, à l'eau fixée par liaisons hydrogène à la protéine, se ferait grâce à une étape intermédiaire où les deux éléments seraient liés par les forces de VAN der WAALS, selon les équilibres :



Si l'on admet ce schéma, la première phase de la réaction de dénaturation pourrait correspondre au déplacement de l'équilibre II vers la gauche ; le fait que l'H.R.E. est en réalité plus faible que celle que laissaient supposer les isothermes de désorption (cf protocole expérimental) indiquerait que le premier équilibre, par contre, n'est que peu ou pas altéré.

Pour une quantité d'eau totale constante, au cours de la première phase, les liaisons hydrogène intéressant un certain nombre de molécules d'eau seraient transformées en attraction de VAN der WAALS ; ceci entraînerait des modifications structurales importantes dont la dénaturation rapide serait la conséquence. Au cours de la deuxième phase de la réaction le nouvel équilibre une fois atteint, l'agitation thermique associée à la présence de molécules d'eau plus mobiles, assurerait une dénaturation plus lente.

3°) Modification de la courbe de sorption à la suite des chocs thermiques.

Indépendamment des phénomènes dynamiques de transfert qui viennent d'être discutés, on constate que la courbe de sorption de la protéine dénaturée est différente de celle de la protéine native. Cette modification semble confirmer le point de vue précédent.

En effet, au cours de la première phase l'affinité de la protéine pour l'eau semble se modifier, la protéine dénaturée fixant moins d'eau que la protéine native ; au cours de la deuxième phase, cette modification ne semble pas se poursuivre : les points correspondant à la RNase chauffée 60 minutes à 52 p.100 d'H.R. (deuxième phase) ne sont pas différents de ceux relatifs à la RNase chauffée 15 minutes (première phase). La modification de l'état de liaison de l'eau s'accompagnerait donc au cours de la première phase de changements structuraux irréversibles tels que certains sites polaires seraient moins accessibles à l'eau.

Cependant, en prolongeant la fraction linéaire des courbes de sorption jusqu'à l'abscisse zéro, on observe que les droites ainsi tracées se coupent au même point sur l'axe des ordonnées ; ceci indique que la fraction d'eau très fortement liée (molécules d'eau liées directement

aux groupements polaires) n'est pas modifiée de façon significative, et que la différence observée sur les courbes de sorption affecte surtout les fractions d'eau moins fortement liée ou l'eau solvante ; nous rejoignons en cela les auteurs signalés par PRIVALOV, et MREVLISCHVILI (1967) dans leur étude exhaustive sur l'hydratation des protéines natives et dénaturées, qui ont montré par des méthodes différentes -calorimétrie, conductibilité, R.M.N.-, que l'hydratation des protéines dénaturées diffère très peu de celle des protéines natives.

II - ETUDE THERMODYNAMIQUE DE L'ETAT ACTIVE.

Les dénaturations thermiques observées -inactivation de la RNase du blé ou du pancréas, perte de viabilité du blé- sont irréversibles. Nous avons donc calculé les énergies d'activation, et grâce à la théorie des états de transition, les fonctions thermodynamiques relatives à l'équilibre entre la protéine native et le complexe activé. On considère dans les interprétations thermodynamiques qui vont suivre que les augmentations de pression décrites dans le protocole expérimental ont une influence négligeable.

A. CALCUL DE L'ENERGIE D'ACTIVATION.

1°) Mode de calcul.

Pour chaque teneur en eau étudiée, nous avons porté $\log_{10} k$ en fonction de $1/T$; la relation obtenue est linéaire dans la plage des températures étudiées.

La pente des droites ainsi obtenues, évaluée graphiquement, a permis de calculer les énergies d'activation :

$$E = - \text{pente} \times R \times 2,3$$

2,3 étant le facteur de conversion des Log en $\log_{10}$.

Les courbes cinétiques étant tracées en fonction du temps exprimé en secondes: k s'exprime en s^{-1} , E en cal/mole et $R = 1,987 \text{ cal/mole} \times ^\circ K$

A la suite de la discussion relative à la cinétique des dénaturations étudiées, il est apparu que celles-ci peuvent s'exprimer comme deux réactions successives d'ordre 1, répondant à l'équation $\text{Log} \frac{c}{c_0} = k t$ dans laquelle k est la constante de vitesse, définie par la pente de la droite représentative.

Les valeurs de la constante k ainsi établies figurent, pour chaque essai, dans les tableaux des paramètres thermodynamiques de l'état activé (tableaux 15 à 19).

Il correspond une valeur de k à chacune des phases successives, et par conséquent, la réaction de dénaturation présente successivement deux valeurs d'énergie d'activation. Les relations obtenues entre $\log_{10} k$ et $1/T$ sont linéaires dans les deux cas et, au moins dans les limites des

températures étudiées, nous n'avons pas observé de variation de l'énergie d'activation, décelable par un changement de pente de la droite et analogue à celle décrite par KALNITSKY et al. (1959) avec la RNase pancréatique en solution, BECKER et SALLANS (1956) dans le cas du gluten à une hydratation de 13,9 p.100, WOESE (1960), BACHRACH et BRESE (1957), dans le cas de virus.

La figure 35 montre à titre d'exemple les relations que nous avons obtenues dans le cas du blé à une teneur en eau de 35 p.100 et dans celui de la RNase pancréatique en solution.

La plupart des calculs d'énergie d'activation effectués sont relatifs à la deuxième phase ; en effet, la très forte valeur de la pente de la première phase rend sa mesure très imprécise, surtout dans les cas où cette première phase est de courte durée. Il a toutefois été possible de calculer l'énergie d'activation relative à la première phase dans quelques cas privilégiés.

2°) Résultats des calculs relatifs aux expériences sur le blé.

a) Résultats.

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 13, en fonction de la teneur en eau, pour chacune des deux phases (activité RNasique et T_m de germination).

Tableau 13 - Energie d'activation (kcal/mole) correspondant aux réactions de dénaturation dans le blé pour les deux critères d'appréciation choisis.

Teneur en eau % s.s.	(1) Activité extractible de la ribonucléase		(2) Temps moyen de germination	
	1ère phase	2ème phase	1ère phase	2ème phase
4,5	-	41,9	-	-
14	-	22,5	-	55,6
22	-	3,7	-	41,9
30	11,6	21,9	-	55,2
35	17,7	30,0	40,5	64,5
45	-	36,0	-	-

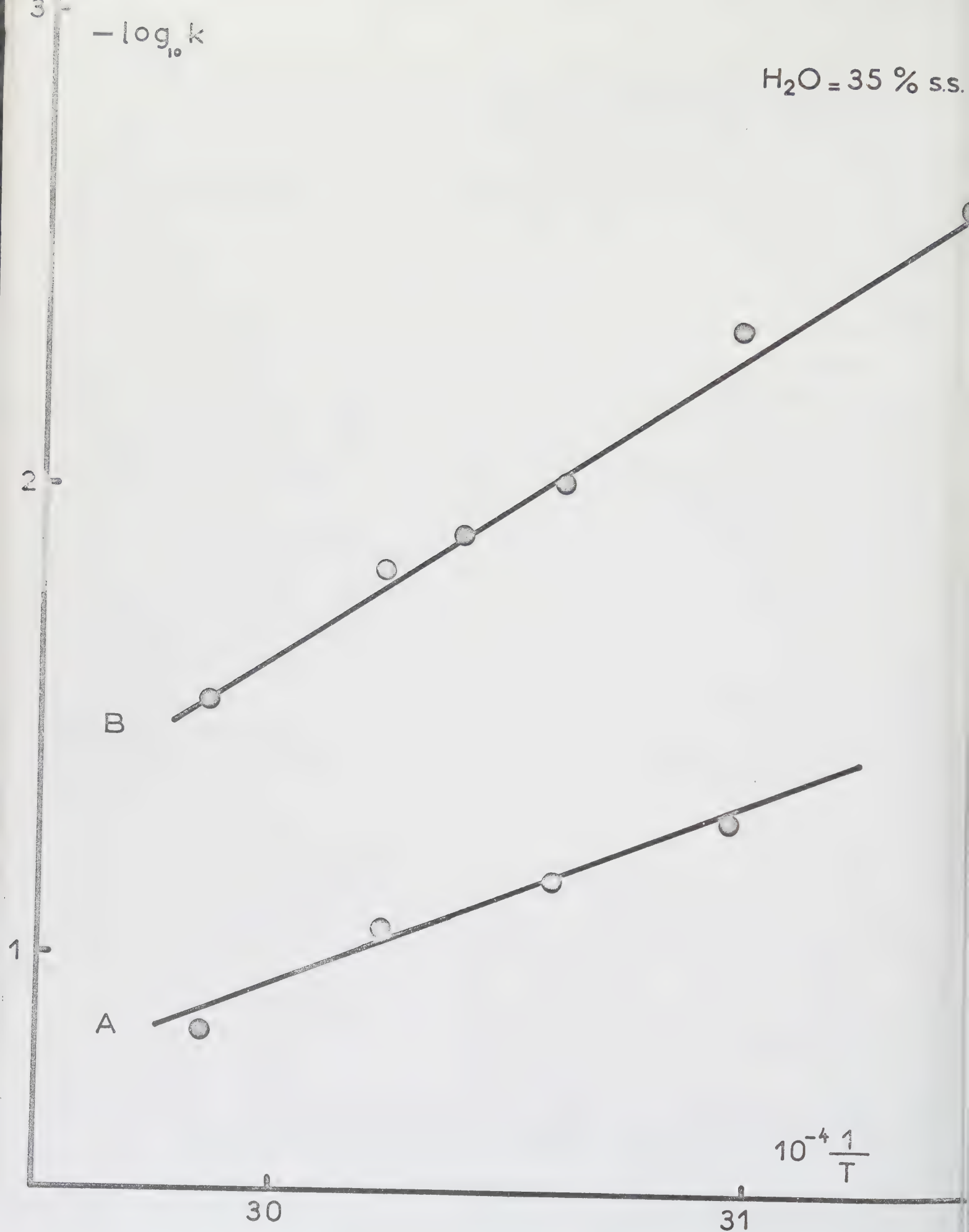


Figure 35 - Dénaturation thermique de la RN-ase extractible du blé hydraté à 35%; variation de la constante de vitesse en fonction de la température, au cours de la 1ère phase (A) et de la 2ème phase de la réaction (B).

b) Discussion.

Deux remarques importantes peuvent être faites à la lecture de ce tableau :

α) L'énergie d'activation correspondant à la deuxième phase est nettement plus élevée que celle correspondant à la première (elle atteint presque une valeur double). Ce fait indique qu'un élément analogue à un catalyseur intervient au cours de la première phase, en abaissant le niveau de la barrière d'énergie.

Des observations analogues ont été faites par KOKA et MIKOLAJCIK (1967) avec la destruction du phage rl dans le lait écrémé et par LICCIARDELLO et al. (1967) dans le cas de la toxine botulinique. Par contre DAOUST et al. (1965) observent l'effet inverse avec différents phages.

β) L'énergie d'activation de la réaction de dénaturation est une fonction de la teneur en eau du milieu au moment du traitement thermique. Il faut souligner que les deux modes, très différents, d'appréciation de la dénaturation, le dosage de l'activité RNasique et le T_m conduisent à une observation identique, même si les valeurs absolues des chiffres sont différentes : l'énergie d'activation relative à la deuxième phase passe par une valeur minimale pour une teneur en eau du grain voisine de 22 p.100 (fig.36). Les résultats expérimentaux ne nous permettent pas d'apprécier si le phénomène correspondant à la première phase est le même.

Parmi les études fragmentaires portant sur l'influence de la teneur en eau sur l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation en milieu solide une seule à notre connaissance montre un effet analogue : elle est relative à l'inactivation thermique de l'O - diphénol-oxydase de la feuille de tabac, (SISLER et JOHNSON, 1965). Les auteurs observent en effet un minimum de l'énergie d'activation pour une teneur en eau de 30 p.100 s.s., bien qu'ils n'aient pas étendu leurs expériences dans un domaine de durée assez grand pour observer nettement la cinétique en deux phases.

Par ailleurs les résultats indiqués par PENCE et al. (1953) et par BECKER et SALLANS (1956), relatifs à la dénaturation des protéines du blé, en particulier du gluten, en fonction d'un choc thermique effectué à teneur en eau constante, apparaissent compatibles avec les observations que nous avons effectuées, bien que les tests utilisés pour suivre la dénaturation ne soient pas les mêmes.

Bien que l'hydratation du gluten soit beaucoup plus élevée que celle que nous avons utilisée au cours de nos essais, les valeurs de l'énergie d'activation (34,3 et 43,8 kcal/mole) calculées par PENCE dans une région correspondant à la première phase de dénaturation sont cohérentes avec celles que nous avons observées.

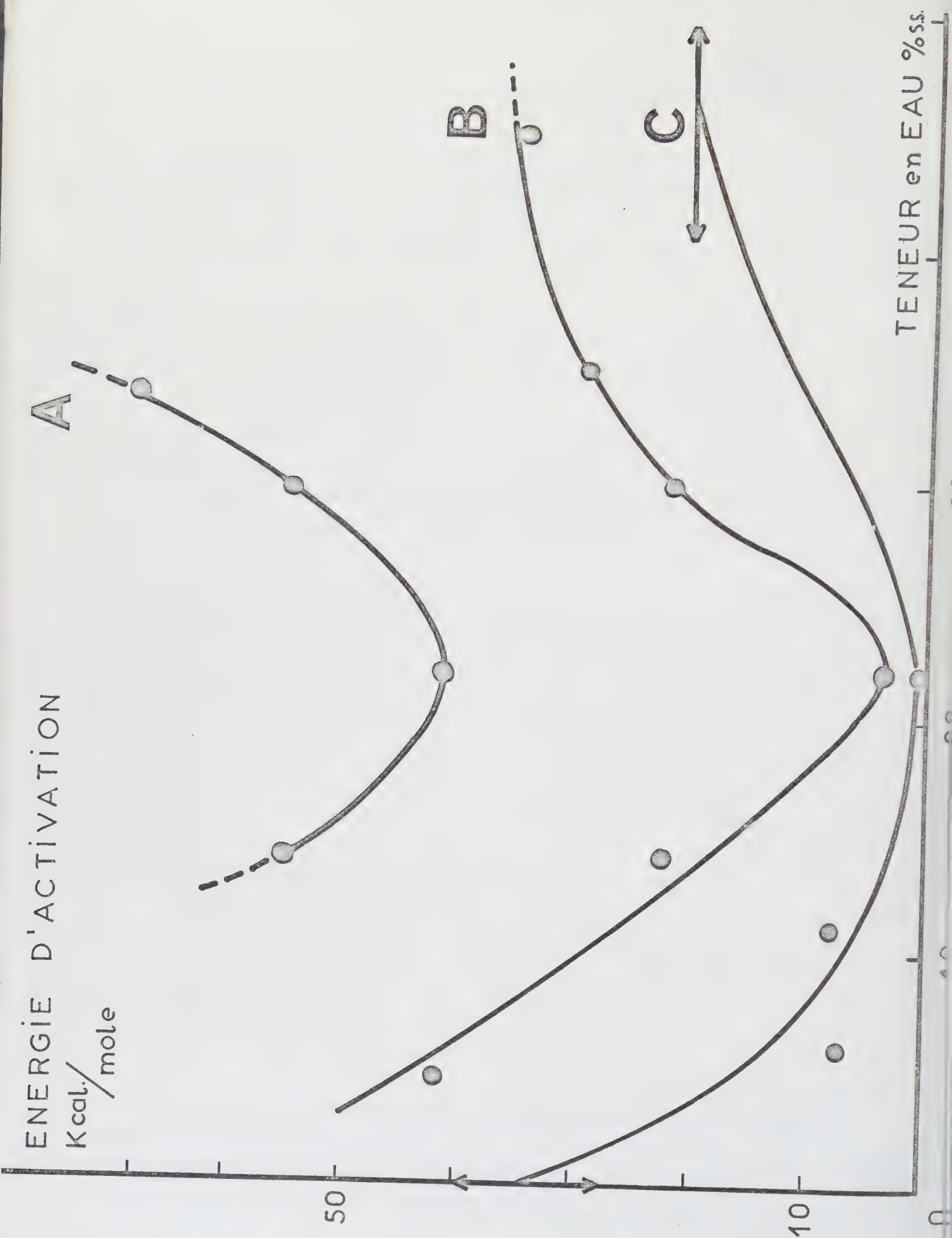


Figure 36 - Evolution, en fonction de la teneur en eau, au cours d'un choc thermique en milieu solide, de l'Energie d'Activation relative à la 2ème phase de la réaction dans le cas du blé (Temps moyen de germination: A - RNase extractible; B - RNase insoluble; C - RNase pancreatique)

De son côté, BECKER à partir de ses propres expériences, et en utilisant les résultats de GEDDES (1929, 1930) trouve que l'énergie d'activation relative à la deuxième phase de dénaturation demeure sensiblement constante (64,6 kcal/mole) jusqu'à une teneur en eau de 28 p.100 s.s., puis diminue brusquement jusqu'à une valeur de 32,7 kcal/mole ; ces valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues à partir du T_m (tableau 13).

Nous rejoignons la conclusion de BECKER relative au rôle de catalyseur que l'eau joue dans les réactions de dénaturation.

3°) Résultats des calculs relatifs à la ribonucléase pancréatique.

a) Pour la ribonucléase en solution ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), nous avons trouvé les énergies d'activation de 10,69 et 18,65 kcal/mole correspondant respectivement à la première et à la seconde phase ; ainsi, même en solution, il s'avère que l'effet catalytique de l'eau est nettement plus grand au cours de la première phase de la réaction que au cours de la seconde.

GAJEWSKA et SHUGAR (1955) montrent que l'énergie d'activation relative à la dénaturation de la RNase pancréatique en solution croît en fonction de la concentration, toutes choses égales par ailleurs. Si l'on trace la courbe, représentant cette variation, on constate que la valeur que nous avons trouvée est en bon accord avec celle-ci.

b) Les résultats des essais de dénaturation de la ribonucléase solide, en fonction de sa teneur en eau, présentent une dispersion plus grande que ceux obtenus dans le cas du blé.

Ceci doit être attribué aux erreurs inhérentes à la pesée d'une prise d'essai de très faible masse et surtout à la variation rapide de teneur en eau qu'elle peut subir, malgré les précautions prises. Néanmoins, nous avons calculé les énergies d'activation relatives à la seconde phase pour six teneurs en eau différentes (tableau 14) :

Tableau 14 - Énergie d'activation correspondant à la deuxième phase de dénaturation de la RNase pancréatique solide, en fonction de la teneur en eau.

H.R.E. °/°	Teneur en eau* °/° s.s.	Energie activation kcal/mole
0	0	27 - 40
21,6	6	6 - 9
52,3	11	8
88	22	0,6
95,48	40 à 50	21
100	$\neq$ (solution)	19

* Teneur en eau appréciée sur la courbe de sorption.

Ces résultats viennent donc confirmer ceux trouvés dans le cas du blé en montrant l'existence d'une énergie minimale pour une hydratation voisine de 22 p.100 (fig. 36). On observe que vers les hautes teneurs en eau la courbe tend vers une valeur asymptotique, peu différente de 21 kcal/mole, plus nettement que dans le cas de la RNase de blé, où ce fait est cependant déjà observable.

La grande incertitude sur les valeurs obtenues à 0 p.100 s'explique facilement. On verra en effet, ultérieurement que l'influence de la teneur en eau sur la dénaturation répond à des lois exponentielles. Or, il est impossible, dans les conditions expérimentales utilisées, bien qu'elles soient très sévères, de préciser si la teneur en eau résiduelle est de 10^{-2} ou 10^{-3} , et de maintenir cette valeur suffisamment constante.

Cependant, il convient de souligner que la plus faible valeur de l'énergie d'activation observée à l'état sec est du même ordre de grandeur que celle indiquée par MULLANEY (1966) pour ce même enzyme déshydraté.

B. PARAMETRES THERMODYNAMIQUES DE L'ETAT ACTIVE.

1°) Mode de calcul.

Les fonctions thermodynamiques de l'état activé sont calculées à partir de la théorie des "états de transition", grâce aux équations suivantes :

$$\Delta H^* = E - 1,98 T$$

cal/mole

$$\Delta F^* = - 2,3 R T \log_{10} \left(\frac{h}{b} \frac{k}{T} \right) = - 4,6 T \log_{10} \left(4,79 \frac{k}{T} 10^{-11} \right)$$

cal/mole

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta F^*}{T}$$

cal/mole . °K

dans lesquelles h représente la constante de PLANK ($6,62 \cdot 10^{-27}$ erg/s); b la constante de BOLTZMAN ($1,38 \cdot 10^{-16}$ erg/°C); R, la constante des gaz parfaits (1,98 cal/mole °K) ; k, la constante de vitesse exprimée en s^{-1} .

2°) Résultats obtenus.

L'application de ces équations a conduit aux résultats consignés dans les tableaux 15 à 19..

3°) Discussion des résultats.

a) Observations

Un certain nombre de remarques peuvent être faites à la lecture de ces tableaux :

Tableau 15 - Dénaturation de la RNase extractible du blé - Paramètres thermodynamiques de l'état activé, correspondant à la première phase de la réaction.

Teneur en eau % S.S.	Température		$k \times 10^2$ s ⁻¹	Energie libre ΔF^* Cal./mole	Enthalpie ΔH^* Cal./mole	Entropie ΔS^* Cal/mole °K
	°C	°K				
30	54	327	0,0788	23 975	10 946	- 39,84
	62	335	0,1220	24 284	10 930	- 39,86
35	45	318	0,0526	23 552	17 070	- 20,38
	50	323	0,0862	23 613	17 060	- 20,28
	54	327	0,1150	23 726	17 052	- 20,41
	56	329	-	-	-	-
	58	331	0,1470	23 863	17 044	- 20,60
	62	335	0,2420	23 824	17 036	- 20,26

Tableau 16 - Dénaturation de la RNase extractible du blé. Paramètres thermodynamiques de l'état activé, correspondant à la deuxième phase de la réaction.

Teneur en eau °/° S.S.	Température		$k \cdot 10^{+2}$ s^{-1}	Energie libre ΔF^* cal/mole	Enthalpie ΔH^* cal/mole	Entropie ΔS^* cal/mole.°K
	°C	°K				
4,5	125	398	0,0088	31 077	41 106	+ 25,17
	132	405	0,0220	30 897	41 092	+ 25,15
14	86	359	0,0279	27 129	21 822	- 19,38
	90	363	0,0395	27 189	21 814	- 19,40
22	68	341	0,0192	25 990	2 998	- 72,03
	74	347	0,0215	26 382	2 986	- 72,03
30	54	327	0,0067	25 583	21 276	- 13,17
	62	335	0,0120	25 837	21 260	- 13,66
35	45	318	0,0042	25 158	28 810	+ 11,48
	50	323	0,0076	25 183	28 800	+ 11,19
	54	327	0,0141	25 098	28 792	+ 11,29
	56	329	0,0208	25 000	28 788	+ 11,51
	58	331	0,0248	25 040	28 784	+ 11,31
	62	335	0,0502	24 378	28 776	+ 11,63
45	40	313	0,0107	24 166	35 374	+ 31,20
	45	318	0,0266	23 984	35 364	+ 31,18

Tableau 17 - Dénaturation des protéines du blé mesurée globalement par l'augmentation du temps moyen de germination. Paramètres thermodynamiques de l'état activé.

Teneur en eau % S.S.	Température		$k \cdot 10^{+2}$ s^{-1}	ΔF^* cal/mole	ΔH^* cal/mole	ΔS^* cal/mole °K
	°C	°K				
14 2ème phase	65	338	0,0067	26 465	54 924	+ 84,49
	72	345	0,0364	27 449	54 910	+ 79,56
22 2ème phase	58	331	0,0070	25 870	41 198	+ 78,16
	62	335	0,0142	25 697	41 190	+ 76,77
30 2ème phase	50	327	0,0030	26 094	54 550	+ 87,02
	62	335	0,0239	26 748	54 534	+ 82,94
35 1ère phase	58	331	0,0880	23 722	39 818	+ 48,62
	62	335	0,1820	24 506	39 810	+ 45,68
35 2ème phase	45	318	0,000651	26 342	63 764	+117,67
	50	323	0,003833	25 624	63 754	+118,04
	54	327	0,007660	25 496	63 746	+116,97
	56	329	0,015510	25 193	63 742	+117,17
	58	331	0,022400	25 106	63 738	+116,71
	62	335	-	-	-	-

Tableau 18 - Dénaturation de la RNase pancréatique en solution.
Paramètres thermodynamiques de l'état activé.

	Température		$k \cdot 10^{+2}$ s^{-1}	ΔF^* cal/mole	ΔH^* cal/mole	ΔS^* cal/mole °K
	°C	°K				
1ère phase	110	383	0,2300	27 380	9 928	- 45,56
	120	393	0,2680	27 994	9 909	- 46,01
	130	403	0,4000	28 404	9 889	- 45,94
	140	413	0,5700	28 838	9 869	- 45,92
	160	433	1,8550	29 255	9 829	- 44,86
2ème phase	90	363	0,0091	28 253	17 928	- 28,44
	100	373	0,0297	28 176	17 908	- 27,52
	110	383	0,0412	28 696	17 888	- 28,21
	120	393	0,1350	28 533	17 869	- 27,13
	130	403	0,1680	29 104	17 849	- 27,92
	140	413	0,1800	29 789	17 829	- 28,95
	150	423	0,5360	29 607	17 819	- 27,89
	160	433	0,6130	30 212	17 789	- 28,69

Tableau 19 - Dénaturation de la RNase pancréatique solide, en fonction de l'hydratation, pour la deuxième phase de la réaction. Paramètres thermodynamiques de l'état activé.

I.R.E. 30°C	Teneur en eau ‰ S.S.	Température		$k \times 10^{+2}$ s^{-1}	ΔF^* cal/mole	ΔH^* cal/mole	ΔS^* cal/mole °K
		°C	°K				
0	0	160 165 175	433 438 448	-	environ 33.000	de 26.000 à 40.000	de - 45 à + 40 (1)
1,6	6	96 110 120	369 383 393	0,0383 0,0443 0,0623	27.673 28.640 29.140	de 5.176 à 8.269 de 5.149 à 8.241 de 5.129 à 8.221	- 61,57 - 61,33 - 61,09
2,3	11	100 120 130	373 393 403	0,0330 0,0490 0,0730	28.092 29.329 29.775	7.254 7.214 7.194	- 55,86 - 56,27 - 56,03
8	22	70 85 100	243 358 373	0,0251 0,0383 0,0393	25.656 26.826 28.296	+ 126 - 102 - 132	- 73,58 - 75,21 - 76,21
5,5	40 à 50	90 110	363 383	0,0083 0,0383	28.320 28.751	20.428 20.388	- 21,74 - 21,83

(1) - L'imprécision de ces résultats à la même origine que celle déjà signalée pour l'énergie d'activation : la teneur en eau résiduelle est difficilement contrôlable.

α) En fonction de la phase considérée, les valeurs des paramètres sont très différentes ; en effet, par rapport aux valeurs observées au cours de la deuxième phase, on remarque pendant la première phase des variations d'enthalpie sensiblement moitié plus faibles et des variations d'entropie beaucoup plus petites ; par contre les variations d'énergie libre sont peu différentes, quoique légèrement moins élevées. Des observations concordantes effectuées sur des virus et sur la toxine botulinique ont été décrites par KAPLAN (1958), KOKA et MIKOLAJCIK (1967) et LICCIARDELLO et al. (1967).

β) En fonction de la température, dans le cas du blé, ΔF^* tend à diminuer, ; par contre, dans le cas de la RNase pancréatique en solution ou solide, on observe que ΔF^* augmente légèrement. Dans tous les cas, l'enthalpie $\Delta H^* = E - RT$ est fonction légèrement décroissante de la température ; quant à l'entropie, elle ne varie jamais de façon significative en fonction de la température.

γ) En fonction de la teneur en eau, dans tous les cas, ΔH^* qui est égal, au facteur RT près, à l'énergie d'activation, passe donc par un minimum pour une teneur en eau de 22 p.100, au moins en ce qui concerne la deuxième phase.

L'entropie ΔS^* (fig. 37) suit évidemment la même variation ; cependant il faut remarquer qu'avec la ribonucléase du blé, au-dessous d'une teneur en eau de 30 p.100, la variation d'entropie est négative ; au-delà de 35 p.100, elle est positive.

b) Signification des paramètres thermodynamiques.

Nous allons essayer maintenant de dégager la signification physique des variations observées des paramètres thermodynamiques.

α) Variation d'énergie libre ΔF^*

Les variations d'énergie libre d'activation ΔF^* , quelles que soient la teneur en eau, la température, la phase de la réaction, la méthode de détection (activité RNasique, germination), demeurent sensiblement les mêmes (valeurs comprises entre 23,6 et 31,0 kcal/mole).

Cette observation est en accord avec l'étude de STEARN (1949) qui remarque que la variation d'énergie libre correspondant à la dénaturation des protéines est assez constante, avec des écarts de l'ordre de 20 p.100 entre les valeurs extrêmes.

On peut voir là une confirmation de ce que les méthodes choisies pour apprécier la dénaturation des protéines -activité de la ribonucléase, temps moyen de germination- traduisent bien ce phénomène.

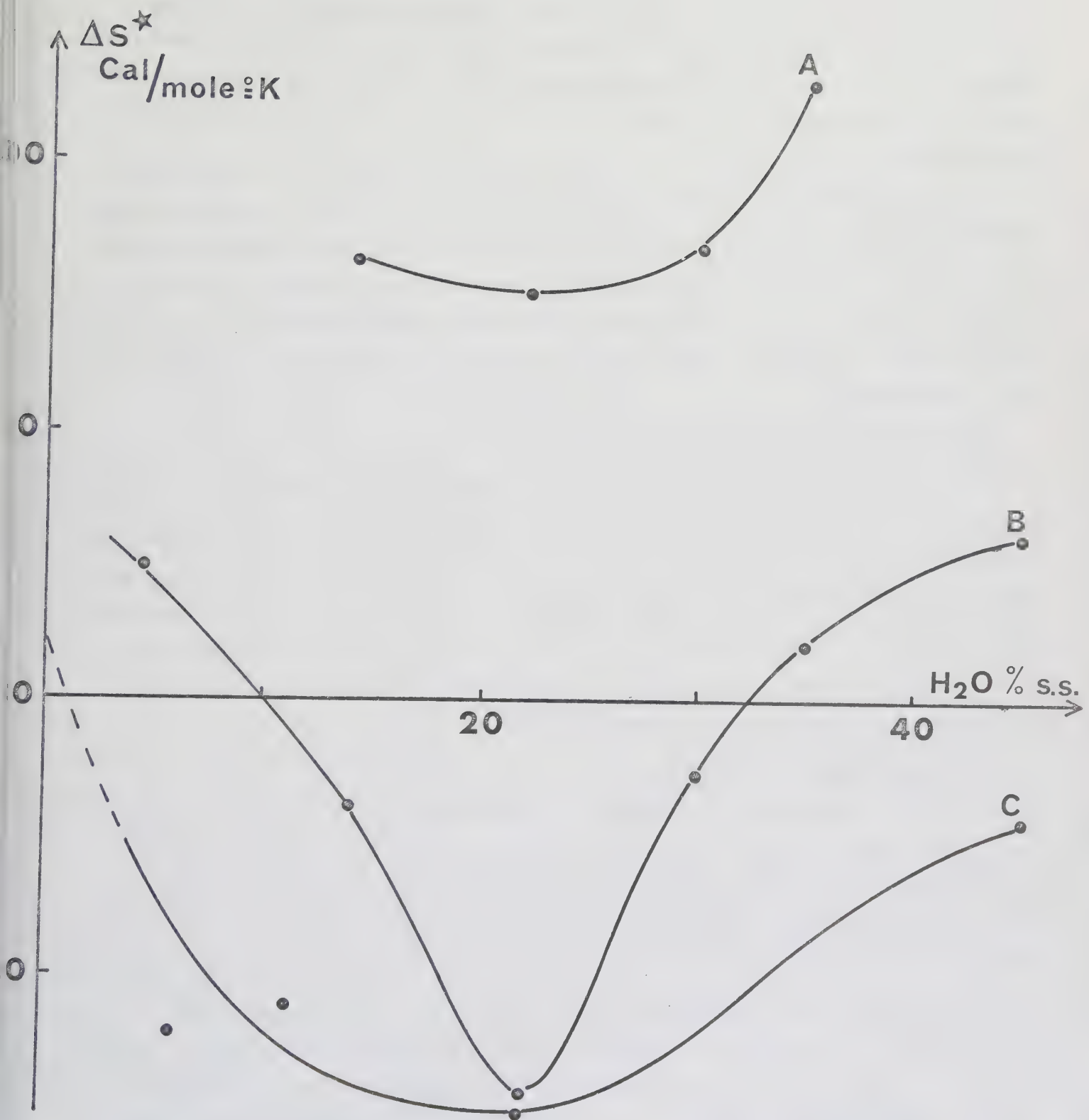


Figure 37 - Variation, en fonction de la teneur en eau, au cours d'un choc thermique en milieu solide, de l'Energie d'Activation, dans le cas du blé (Temps en: A, RNase extractible:B) et dans le cas de la RNase pancréatique solide

Il faut cependant noter que l'équation permettant le calcul de ΔF^* dépend assez peu de k , puisque ΔF^* varie dans le rapport 1 à 5 quand k varie de 1 à 10^{17} ; par contre, ΔF^* varie avec la température de façon plus appréciable. Dans la zone de températures de dénaturation (50°C à 150°C), ΔF^* varie effectivement dans les limites remarquées par STEARN; il nous semble que la valeur de ΔF^* soit plus une caractéristique de la température à laquelle la réaction a lieu, que du mécanisme de la réaction.

La variation d'énergie libre ΔF^* représente la différence d'énergie entre les liaisons avant et après activation, énergie récupérable sous forme de travail; ΔF^* étant positif, la réaction est endergonique (elle ne peut avoir lieu spontanément). La relative constance de cette énergie libre, malgré des variations importantes de l'enthalpie d'activation, est due au fait que la variation d'entropie est également très importante.

β) Variations d'enthalpie ΔH^*

La variation d'enthalpie ΔH^* représente la quantité d'énergie qu'il faut fournir, sous forme d'énergie cinétique, pour que l'activation ait lieu; au facteur RT près, ΔH^* est égal à l'énergie d'activation. Cette barrière d'énergie potentielle, qui doit être franchie par le système pour qu'il y ait dénaturation, est minimale pour une teneur en eau voisine de 22 p.100: en ce sens, on peut dire que l'eau joue un rôle catalytique en abaissant la barrière d'énergie. Ce rôle est le plus marqué au cours de la première phase.

γ) Variations d'entropie ΔS^*

Les variations d'entropie accompagnant le phénomène d'activation sont assez faibles en valeur absolue, surtout si on les compare à celles relatives à l'ensemble de la réaction. Ces dernières sont, en effet, assez élevées, allant de 100 à 320 unités d'entropie, comme le souligne DAWES (1962) dans une discussion générale du problème.

Ceci tend à montrer que le phénomène d'activation modifie relativement peu l'état structural, mais par contre, rend cette même structure beaucoup plus fragile; la modification de quelques liaisons supplémentaires permet alors de passer de l'état activé à l'état dénaturé, avec un effondrement complet de la structure, accompagné d'une large augmentation d'entropie. Ce point de vue rejoint celui de STEARN (1949).

On observe sur les tableaux 15 à 19 que la variation d'entropie d'activation passe par un minimum en fonction de la teneur en eau, et parfois change de signe. Les valeurs négatives de ΔS^* indiquent qu'il y a diminution de l'entropie au cours de l'activation, ce qui équivaut à

la formation d'une configuration moléculaire plus ordonnée ; on peut concevoir en particulier la formation d'un complexe du type :

$P_N + H_2O \rightleftharpoons (P_N - H_2O)^*$ ou $P_N + P_N \rightleftharpoons 2P_N^*$, avec apparition de liaisons supplémentaires, ayant pour conséquence une diminution des degrés de liberté de la molécule protéique ; plus grande est la valeur absolue de ΔS et plus grande est l'augmentation de l'état d'ordre ainsi créé au niveau du complexe activé. Par contre, des valeurs positives de ΔS^* indiquent une augmentation de l'entropie, c'est-à-dire la formation d'un complexe activé où l'état de désordre augmente par rapport à la molécule native ; ceci pourrait correspondre au cas où les molécules d'eau joueraient le rôle d'agent rupteur de certaines liaisons existantes en augmentant les degrés de liberté de la protéine. Le fait que ΔS^* soit positif ou négatif n'est pas spécifique de la phase de la réaction, mais semble dépendre de la teneur en eau et de la nature de la protéine ou du mode d'appréciation de la dénaturation, ΔS^* est toujours négatif dans le cas de la RNase pancréatique solide et en solution, où se trouvent en présence seulement l'eau et une protéine pure ; ΔS^* est toujours positif dans le cas de la mesure du T_m qui rend compte globalement d'un état général de dénaturation du grain ; il est partiellement positif et négatif dans le cas de la RNase extractible du blé où un entourage biochimique complexe interfère avec les réactants ; dans ce dernier cas, on constate que ΔS^* , négatif pour les hydratations comprises entre 14 et 30% est positif au-delà de ces valeurs.

Dans tous les cas, ΔS^* passe par une valeur minimale en fonction de la teneur en eau du milieu, ce qui revient à dire que pour une hydratation voisine de 22 p.100, la formation du complexe activé correspond à un état d'ordre maximal, état qui diminue vers les teneurs en eau plus faibles et plus élevées.

La variation ΔS^* au cours de la première phase est plus faible que celle relative à la deuxième phase, pour une même teneur en eau : l'état d'ordre du complexe activé est le plus grand au cours de la première phase de la réaction.

Ainsi, il semble que l'eau intervient directement dans l'élaboration de la structure instable de la molécule activée, avec des rôles cependant variés.

Tout ceci souligne la complexité et la diversité des mécanismes de dénaturation qui font intervenir, outre les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et les ponts disulfures, les molécules d'eau selon des processus encore mal élucidés.

c) Corrélation entre les variations d'entropie et d'enthalpie.

La relation mise en évidence par LEFFLER (1955), relative à certaines réactions de chimie organique, et vérifiée par YON (1969) avec de très nombreuses réactions de dénaturation en solution est également vérifiée par nos résultats expérimentaux, obtenus en milieu solide.

En effet, toutes les valeurs relatives à nos expériences sur la RNase de blé, la RNase pancréatique solide et en solution, et au temps moyen de germination, sont disposées sur une droite unique, quelles que soient les teneurs en eau et les températures des chocs thermiques (fig. 38). Son équation, calculée par la méthode des moindres carrés, est :

$$\Delta S^* = 0,0030 \quad \Delta H^* - 0,078 \quad (1)$$

ΔS^* étant exprimé en kcal/mole $\times$ °K et ΔH^* en kcal/mole.

A l'aide de 82 exemples différents décrits dans la littérature sur des substances très variées (gluten, hémoglobine, albumine, enzymes divers, , virus, phage), étudiés dans des conditions diverses de température, d'hydratation, de pureté, nous avons calculé l'équation de la droite :

$$\Delta S^* = 0,0030 \quad \Delta H^* - 0,075 \quad (2)$$

On peut considérer ces deux équations comme identiques, aux erreurs expérimentales près.

La pente de ces droites est égale à l'inverse d'une température absolue de valeur: $T = 333^\circ\text{K}$, soit 60°C .

Une relation analogue existe également entre les paramètres ΔS et ΔH relatifs à la réaction complète ; la droite obtenue passe sensiblement par l'origine, et possède une pente identique. La température de 60°C correspondant à la pente semble donc caractériser non seulement l'activation, mais encore toute la réaction de dénaturation.

LEFFLER en déduit qu'à 60°C toutes les réactions ont la même constante de vitesse ; elles procèdent donc à une vitesse identique, 60°C étant une température "isocinétique". Cette hypothèse, qui, comme le souligne YON (1969) semble difficile à admettre pour des raisons théoriques, ne correspond pas à nos observations expérimentales, et nous avons été amenés à rechercher une nouvelle interprétation de ces faits.

a) Interprétation thermodynamique.

La relation bien connue : $\Delta H^* = \Delta F^* + T \Delta S^*$ (3) valable à pression et température constantes, que l'on peut encore écrire :

$$\Delta S^* = \frac{1}{T} \quad \Delta H^* - \frac{\Delta F^*}{T} \quad (4)$$

montre que, en supposant ΔF^* constant, supposition vérifiée par ailleurs, la liaison entre les paramètres ΔS^* et ΔH^* dépend de la température : elle doit s'exprimer par une famille de droites, chacune correspondant aux réactions effectuées à une température donnée.

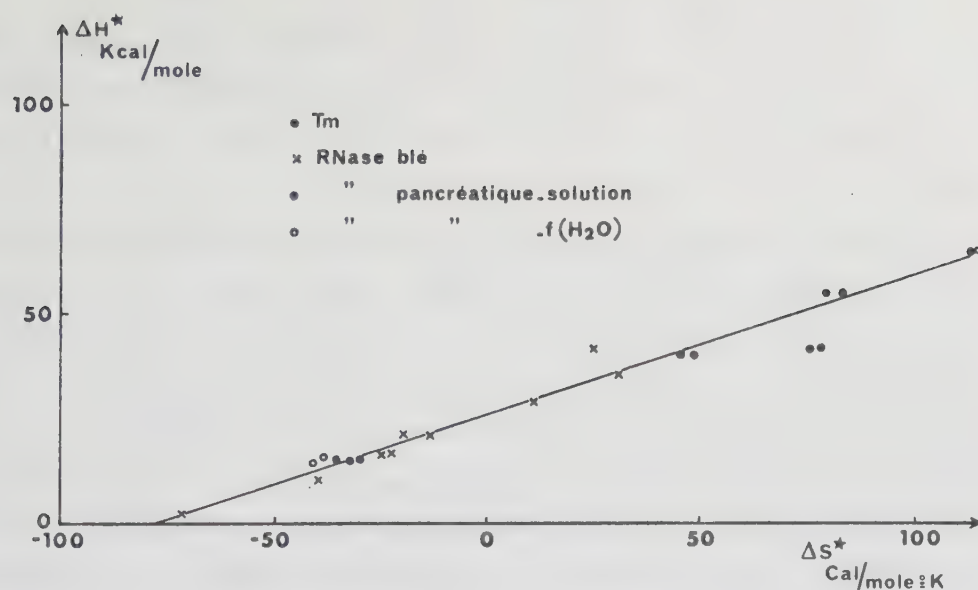


figure 38 - Corrélation entre l'Enthalpie d'activation et l'Entropie d'activation relatives aux chocs thermiques réalisés tant sur le blé que sur la RNase pancréatique à diverses températures, teneurs en eau et durées. Equation de la droite : $\Delta S^* = 0,0030 \Delta H^* - 0,078$.

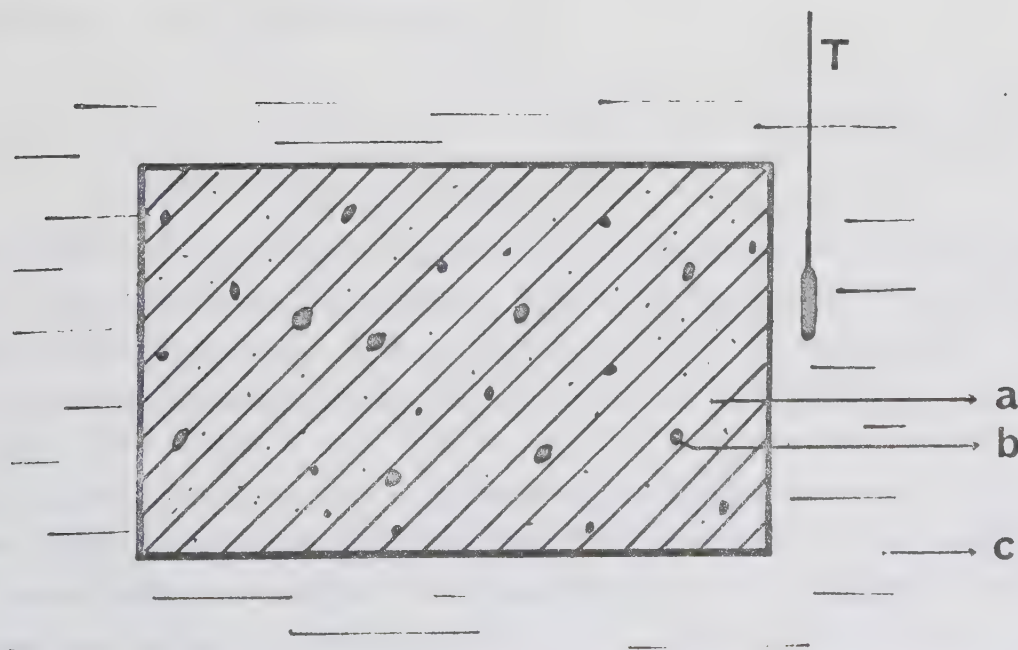


figure 38 bis - Modèle physique présentant une analogie thermodynamique avec la dénaturation des protéines ;
 - phase continue solide ; b - fragment d'une substance solide susceptible de subir une monotropie ; c - milieu extérieur à une température T_a T (bain thermostaté, température T).

Or, les points expérimentaux obtenus pour des températures de dénaturation s'échelonnant de 40 à 200°C, sont loin de recouvrir la surface délimitée par ce faisceau de droites se coupant en un même point de coordonnées $\Delta S^* = 0$ et $\Delta H^* = \Delta F^* = 25$. Ils se disposent au contraire sur une seule droite dont la pente $1/T$ correspond à une température de 60°C.

Il faut donc en conclure que toutes les réactions observées se produisent effectivement à 60°C. Il semble, et c'est l'hypothèse que nous proposons, que 60°C soit une température de transformation à pression constante analogue à celles observées lors des changements d'état. Au niveau d'une molécule en cours de dénaturation la température serait de 60°C sous la pression atmosphérique normale, quelle que soit par ailleurs la valeur mesurable de la température du milieu ambiant, constitué par les autres molécules non activées ou déjà dénaturées. La comparaison suivante permet d'illustrer l'hypothèse proposée pour ce mécanisme de la dénaturation. Supposons un système isolé (fig. 38 bis) à une température T , constitué d'une dispersion dans une phase solide, continue et inerte, d'une substance S susceptible de subir à une température constante $T_a > T$ et sous une pression constante, une transition allotropique irréversible, encore appelée monotropie. (PASCAL, 1953).

Lorsque le système est soumis à une élévation de température, sous pression constante, un gradient de température s'établit tout d'abord à travers la phase continue, entre le milieu extérieur et les fragments de substance S . Au bout d'un certain temps correspondant à la pénétration de la chaleur (phase de latence), les fragments S subissent la transition en nombre d'autant plus élevé, et avec une vitesse d'autant plus grande que la quantité de calories fournie est plus importante, celle-ci étant ici fonction de la température du milieu extérieur.

Ce modèle fournit une analogie satisfaisante sur le plan thermodynamique, expliquant la relation observée entre ΔS et ΔH . Cette proposition rejoint d'ailleurs la théorie du mécanisme "à deux états" discutée par LUMRY et al.. (1966) et relative à la transconformation des protéines.

A l'appui de cette hypothèse, remarquons que dans l'étude de l'expansion thermique des protéines de l'albumine d'oeuf (POLLARD, 1964), un ralentissement brusque de l'accroissement de volume est justement observé pour une température voisine de 60°C. Ce fait rappelle le changement brusque de ΔV observé dans les transitions de première espèce ; l'étude de celles-ci montre également qu'à une température donnée, il faut une variation de pression assez importante pour obtenir la transformation : c'est aussi le cas de la dénaturation qui ne peut être

produite que par des pressions très élevées (YON, 1969). Ceci justifie d'ailleurs que les faibles variations de pression mesurées dans les enceintes de choc thermique n'aient pu modifier de façon appréciable la réaction.

Il faut remarquer que cette analogie n'explique pas les altérations observées à une température inférieure à 60°C. Cependant celles-ci ne s'observent que dans des conditions très particulières : pH extrêmes ou matériel vivant (blé humide). Dans ce dernier cas, on peut penser que des manifestations vitales, respiration par exemple, puissent fournir l'énergie nécessaire à des élévations de température localisées. Par ailleurs, les réactions impliquées peuvent être différentes (oxydation, réaction de Maillard par exemple).

Ainsi, il semble y avoir une analogie profonde, au moins au point de vue thermodynamique, entre la dénaturation et la transition monotrope. Il serait intéressant de réaliser le modèle décrit et d'étudier la cinétique de la transformation, afin de voir si l'analogie peut être poursuivie.

Il convient de noter que l'existence de la droite de LEFFLER implique, outre la température de 60°C, une valeur constante de $\Delta F^\ddagger$; en effet, en rapprochant les relations (1) et (4) et en sachant que $\frac{1}{T} \neq 0,003$ on voit que $\Delta F^\ddagger = T \cdot 0,078$, soit $\Delta F^\ddagger \approx 26.000$ cal/mole ; c'est précisément la valeur moyenne observée dans toutes les dénaturations, ainsi que le souligne STEARN.

β) Interprétation en relation avec l'hypothèse de EYRING et STEARN
.....
sur les liaisons impliquées.
.....

Selon cette hypothèse, la dénaturation correspond essentiellement à la rupture de deux types de liaisons. D'une part, la liaison disulfure est rompue avec une variation ΔH de 20 kcal/mole et avec une variation d'entropie ΔS négligeable. D'autre part, un nombre n de liaisons hydrogène sont rompues avec chacune une variation $\Delta H = 4$ ou 5 kcal/mole et $\Delta S = 0,012$ kcal/mole .°K.

Comme le soulignent STEARN (1949), ainsi que BECKER et al. (1956) il est possible de calculer le nombre n de liaisons hydrogène rompues :

$$n = \frac{\Delta H^\ddagger - 20}{4} \quad (1) \quad \text{ou encore} \quad n = \frac{\Delta S^\ddagger}{0,012} \quad (2)$$

En éliminant n entre (1) et (2), il vient

$$\frac{\Delta H^* - 20}{4} = \frac{\Delta S^*}{0,012} \quad \text{soit}$$

$$\Delta S^* = 0,0030 \quad \Delta H^* = 0,060.$$

relation très comparable à celle trouvée expérimentalement.

En admettant comme variation d'enthalpie correspondant à la rupture de la liaison S-S. une valeur de 25 kcal/mole au lieu de 20, la relation s'identifie alors parfaitement à celle correspondant à la droite expérimentale :

$$\frac{\Delta H^* - 25}{4} = \frac{\Delta S^*}{0,012} \quad \text{soit}$$

$$\Delta S^* = 0,0030 \quad \Delta H^* = 0,075.$$

Ainsi l'hypothèse d' EYRING conduit à la relation observée, en admettant toutefois que l'énergie de rupture de la liaison S-S. est légèrement plus grande que ne le suppose cet auteur.

Nous avons pu vérifier expérimentalement dans le cas de la RNase pancréatique solide, conditionnée à 50 p.100 d'H.R.E. et soumise à un choc thermique à 120°C (cf. page 63), que la dénaturation s'accompagne de la variation du nombre de liaisons disulfures, en fonction de la durée du traitement. Pendant la période correspondant sensiblement à la première phase de dénaturation, on observe une libération rapide de SH en nombre cependant très limité puisque cela représente 1 pont S-S rompu pour 20 molécules, alors que la perte d'activité est de l'ordre de 80 p.100. Au cours de la deuxième phase le nombre de groupements SH libres dosables diminue très rapidement et devient pratiquement nul. Ces résultats semblent indiquer un phénomène complexe dont l'étude mériterait d'être approfondie. Ils rejoignent les observations de KOKA et al. (1968) qui trouvent sur le lait écrémé pour des traitements thermiques de durée constante un accroissement du nombre de SH libérés entre 65 et 95°C, suivi d'une diminution de ceux-ci, au-delà de ces températures. Il apparaît par ailleurs, que les phénomènes observés lors d'un traitement thermique diffèrent de ceux qui ont été obtenus par réduction chimique (WHITE et al., 1959 ; WHITE, 1961).

III - RELATIONS OBSERVEES ENTRE LES TROIS FACTEURS PRINCIPAUX DU CHOC THERMIQUE. (teneur en eau, température, durée).

A partir des résultats expérimentaux obtenus, nous avons tenté de dégager le maximum de relations de dépendance entre les trois facteurs conditionnant le phénomène : la température, la teneur en eau et la durée.

A. ASPECTS STATISTIQUES.

L'évolution de l'activité résiduelle, pour une durée donnée de traitement, en fonction, soit de la teneur en eau (fig. 39), soit de la température (fig. 40 et 41) a une allure sigmoïde.

Il est intéressant de considérer chaque molécule enzymatique comme un individu d'une population, pouvant répondre par un phénomène de tout ou rien (dénaturation ou non) à un choc thermique donné.

Dans ces conditions, en portant ces pourcentages d'inactivation sur une échelle de probabilité, on observe une relation sensiblement linéaire en fonction du logarithme de la teneur en eau, ou de la température (fig. 42 et 43). Ceci indique que les distributions considérées sont chacune log-normales.

Ainsi envisagés, du point de vue "survie" des molécules enzymatiques au bout de 30 minutes, les facteurs température et teneur en eau ont sur la population un effet analogue à celui observé classiquement en toxicologie ; on sait en effet que la distribution des doses d'un poison est le plus souvent log-normale.

Cette constatation implique que la mesure d'un pourcentage donné d'inactivation x traduit, au niveau moléculaire, la perte d'activité par suite d'un changement de structure, de x molécules enzymatiques sur 100 initialement actives ; elle serait incompatible avec un mécanisme correspondant à une baisse d'activité globale de x p.100 de chaque molécule enzymatique.

Ceci s'accorde également avec l'image présentée au chapitre précédent d'une dénaturation "tout ou rien" frappant en quelque sorte au hasard les molécules enzymatiques dispersées dans le milieu.

Il est ainsi possible de définir soit une température moyenne, soit une teneur en eau moyenne de dénaturation : ce sont celles correspondant, toutes choses égales par ailleurs, à un pourcentage cumulé relatif de 50 p.100 de molécules dénaturées, facilement mesurables sur le graphique de probabilité.

On observe sur la figure 43 que la variance de la distribution des logarithmes des teneurs en eau ne dépend pas de la température. Le coefficient de variation de cette distribution diminue par contre avec la température ; on calcule que pour les températures de 60, 80 et 100°C il est égal respectivement à 4,68, 3,47 et 2,85 p.100.

B. RELATIONS ENTRE LA TEMPERATURE ET LA DUREE D'INACTIVATION.

REED (1966) souligne que lorsqu'on chauffe une solution enzymatique, les deux paramètres durée et température sont liés, pour un degré d'inactivation donné, par une relation logarithmique.

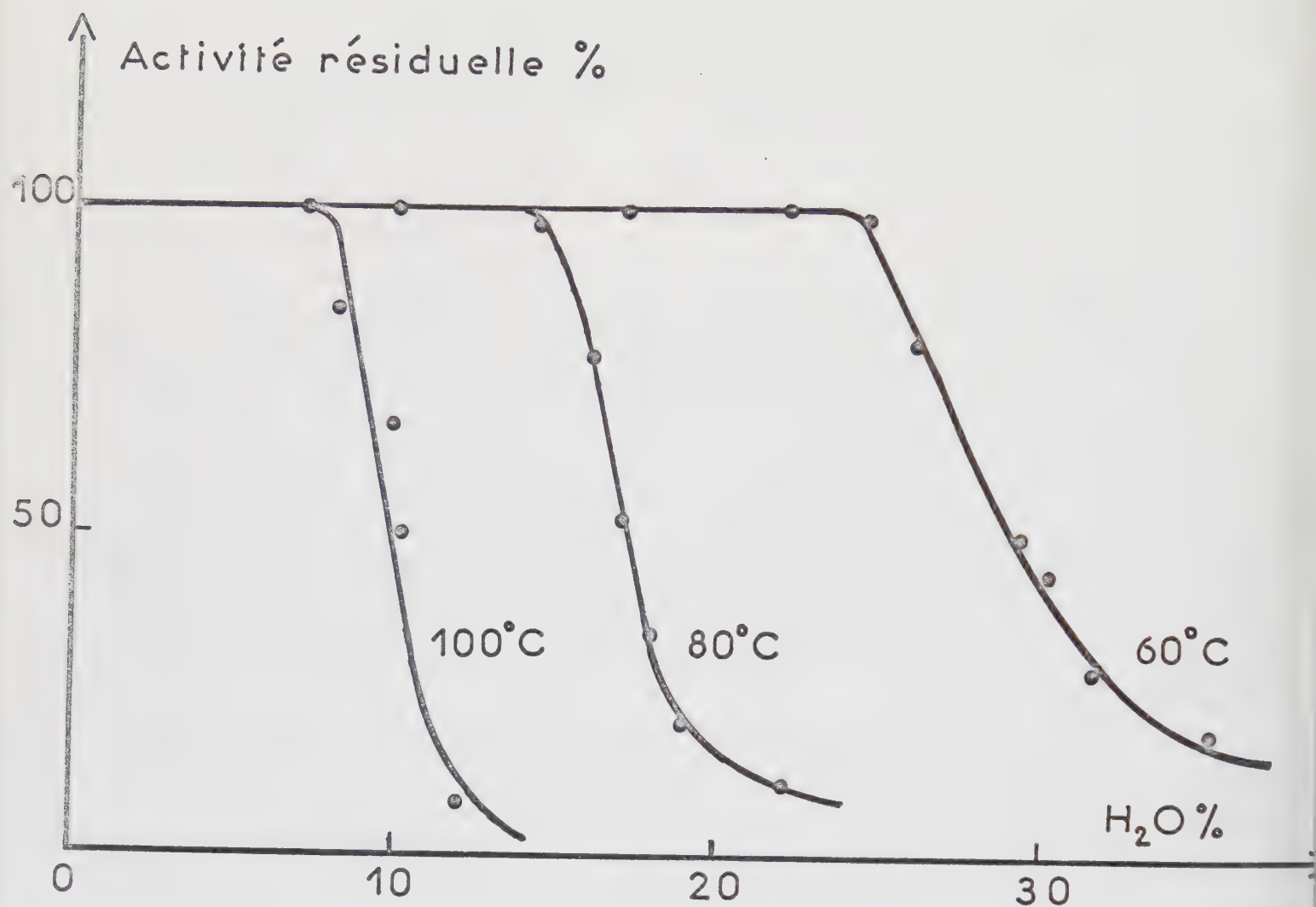


Figure 39 - Evolution de l'activité RN-asiqne extractible, en fonction de la teneur en eau du blé, soumis à des chocs thermiques de 30 minutes, aux températures de 60 , 80 et 100°C.

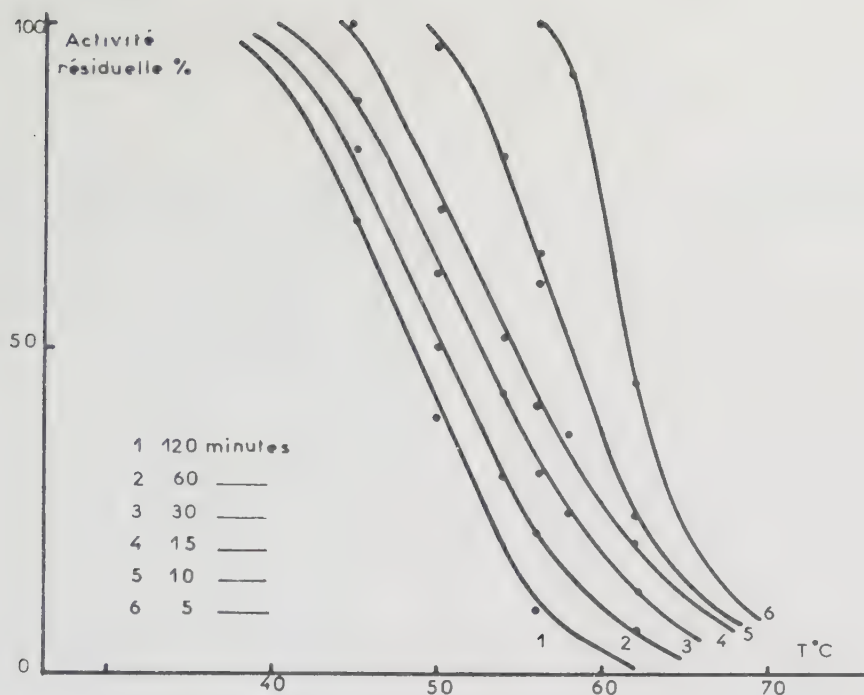


Figure 40 - Evolution, en fonction de la température de l'activité RN-ase résiduelle du blé, après diverses durées de chocs thermiques réalisés sur du blé hydraté à 35%.

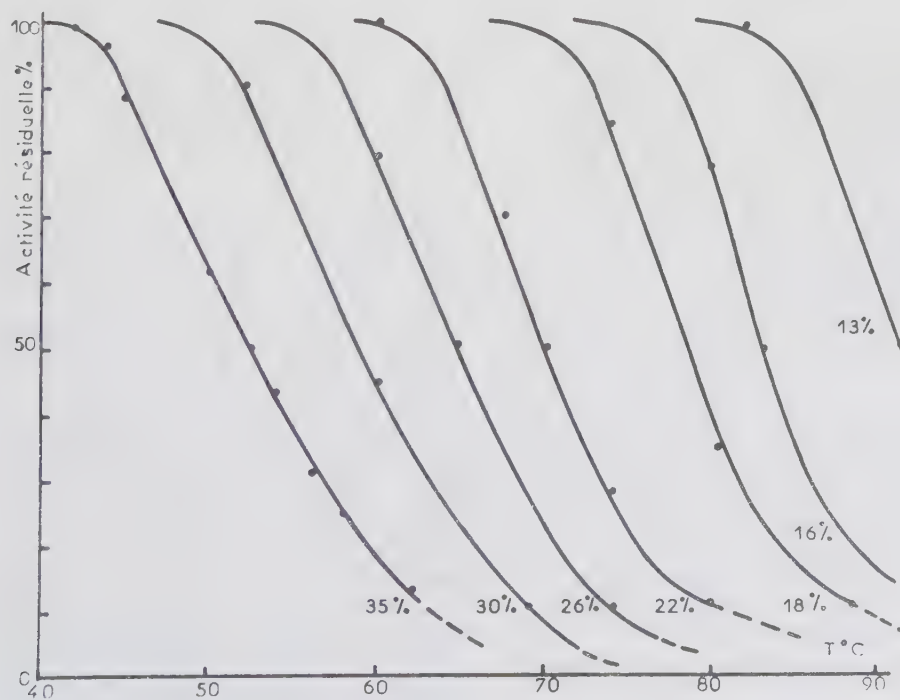


Figure 41 - Evolution, en fonction de la température, de l'activité RN-ase résiduelle du blé après un choc thermique de 30 minutes, pour diverses teneurs en eau du grain.

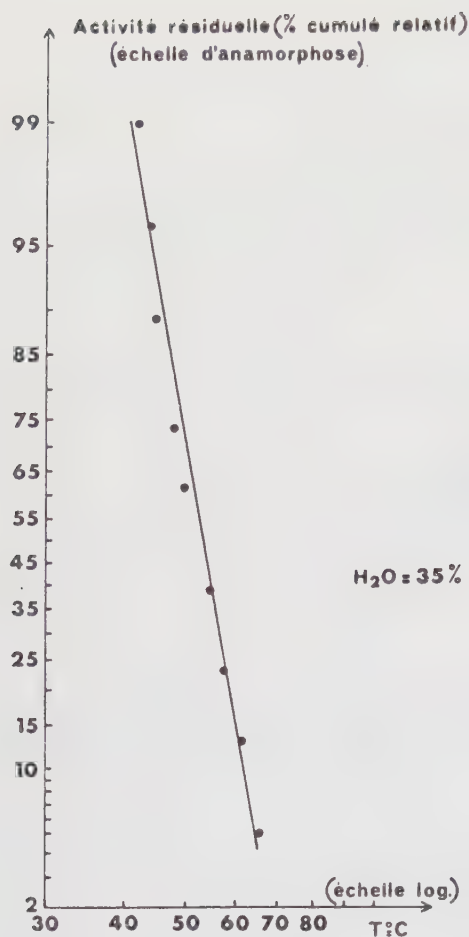
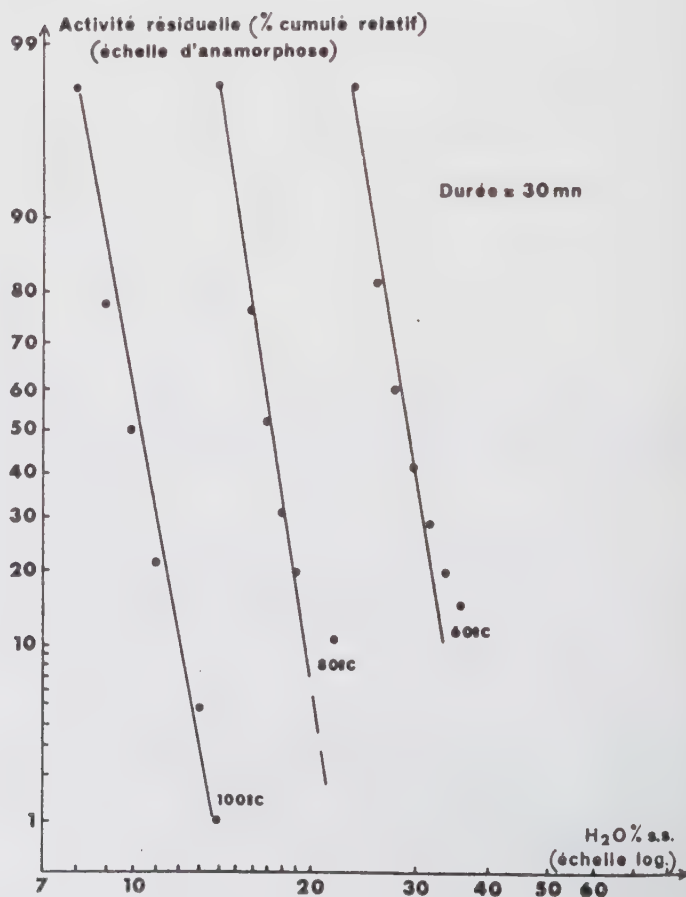


Figure 42 - Activité RN-asiqne extractible résiduelle après un choc thermique de 30 minutes sur le blé hydraté à 35%, considérée comme la distribution de fréquence des molécules inactivées en fonction de la température.

Figure 43 - Activité RN-asiqne extractible résiduelle après un choc thermique de 30 minutes sur du blé, considérée comme la distribution de fréquence des molécules inactivées en fonction de la teneur en eau, pour 3 températures différentes.



Il est intéressant de constater que lors de la dénaturation en milieu solide, pour une teneur en eau déterminée, les mêmes lois sont respectées : la figure 44 montre les résultats expérimentaux obtenus dans le cas de l'activité RNasique du blé.

On constate notamment que les droites représentant la variation de la température moyenne en fonction de la durée pour diverses teneurs en eau sont sensiblement parallèles. Considérons l'équation générale de cette famille de droites :

$$\text{température moyenne} = a \log (\text{durée}) + b$$

la pente a , est une constante et le coefficient b (qui a la valeur de la température moyenne pour une durée de traitement de 1 minute) est fonction de la teneur en eau ; graphiquement, nous avons relevé les valeurs suivantes de b :

Tableau 20 - Valeurs de la constante b en fonction de la température.

Teneur en eau % s.s.	4.5	14	22	30	35	45
b °C	145	100	83	73	67	57

On constate qu'il y a une relation logarithmique entre ce coefficient b et la teneur en eau (fig. 45).

C. RELATIONS ENTRE LA TEMPERATURE ET LA TENEUR EN EAU.

Toutes choses égales par ailleurs, la relation entre les températures moyennes et les teneurs en eau moyennes est logarithmique.

Pour différents niveaux de dénaturation (fig. 46), ou pour différentes durées de traitement (fig. 47), on observe que les droites obtenues sont parallèles.

Une relation semblable, établie dans le cas où la dénaturation du blé est appréciée par la mesure du T_m , ainsi que des observations analogues relevées dans la littérature semblent montrer que le phénomène, très général, caractérise la réaction de dénaturation.

En extrapolant dans la zone des hautes humidités relatives les isothermes de désorption, il est possible de déterminer pour chaque température la fraction d'eau solvante; telle qu'elle est définie par GUILBOT et LINDENBERG (1960). Dans nos conditions expérimentales (cf chapitre II), la désorption semble ne pas se produire, l'H.R.E. au cours du choc thermique étant voisine sinon inférieure à sa valeur initiale. Aussi la fraction d'eau solvante correspondant à chaque teneur en eau a-t-elle été déterminée sur la courbe de sorption du blé à 30°C.

La relation entre la température et la teneur en eau solvante nécessaire pour obtenir 50 p.100 d'inactivation (température et teneur en eau moyenne) en 30 minutes est également de nature logarithmique ; cette

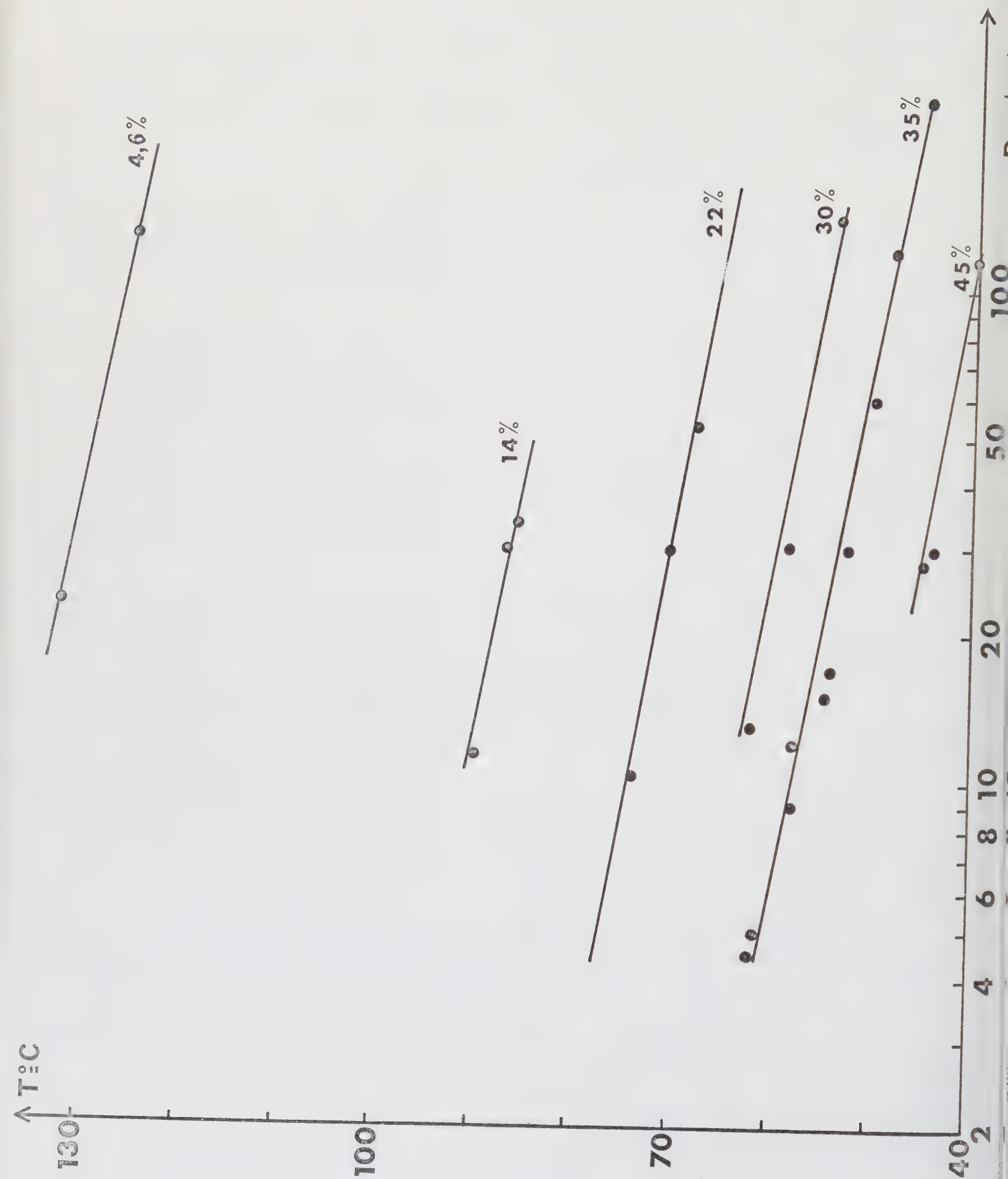


Figure 44 - Relation entre la température et la durée d'un choc thermique permettant d'obtenir une perte d'activité de 50% de la RN-ase extractible du blé pour diverses hydratations.

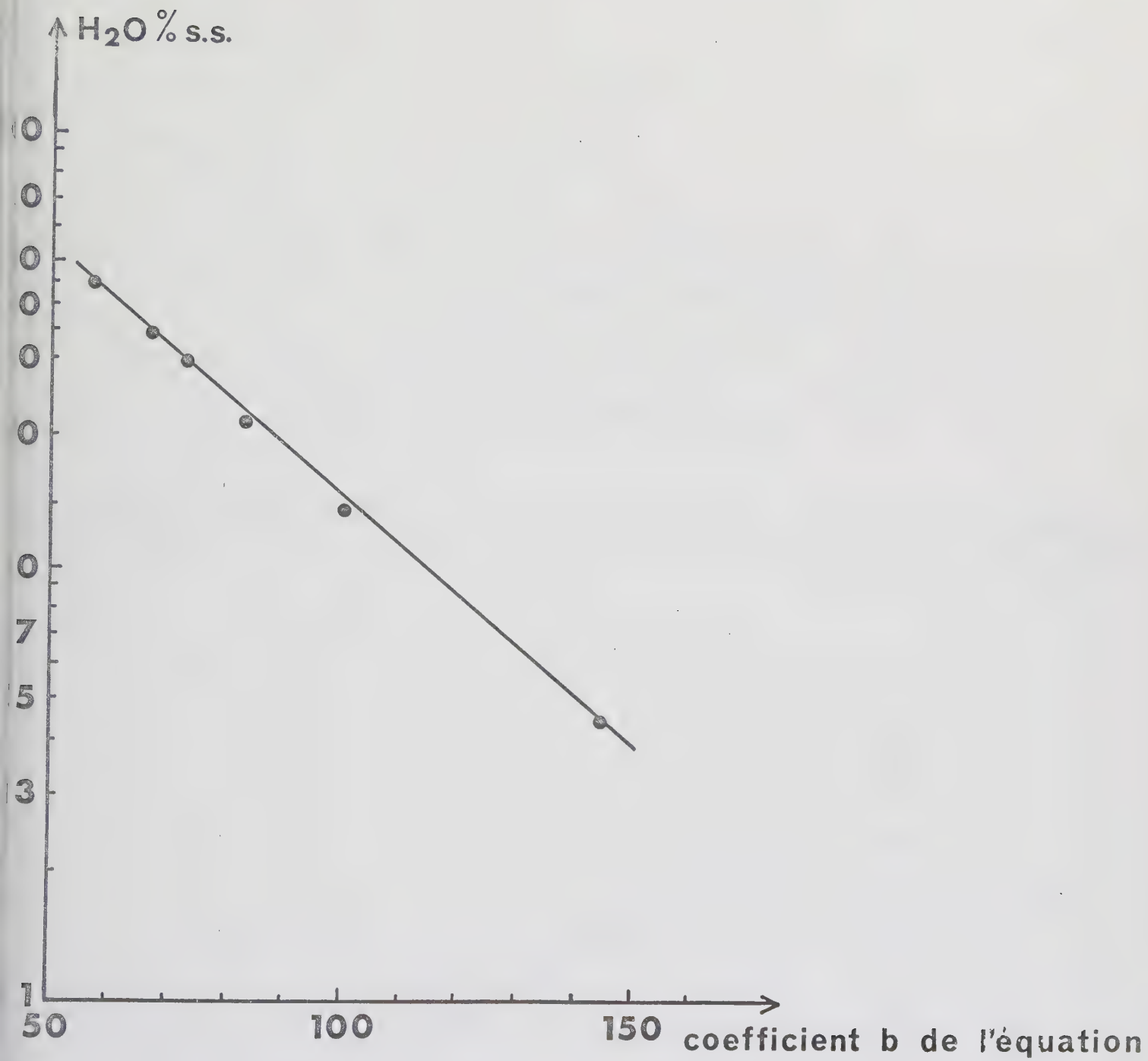


Figure 45 - Evolution en fonction de la teneur en eau du blé au moment du choc thermique, du coefficient b de l'équation :
 $\text{température moyenne} = a \log (\text{durée}) + b$

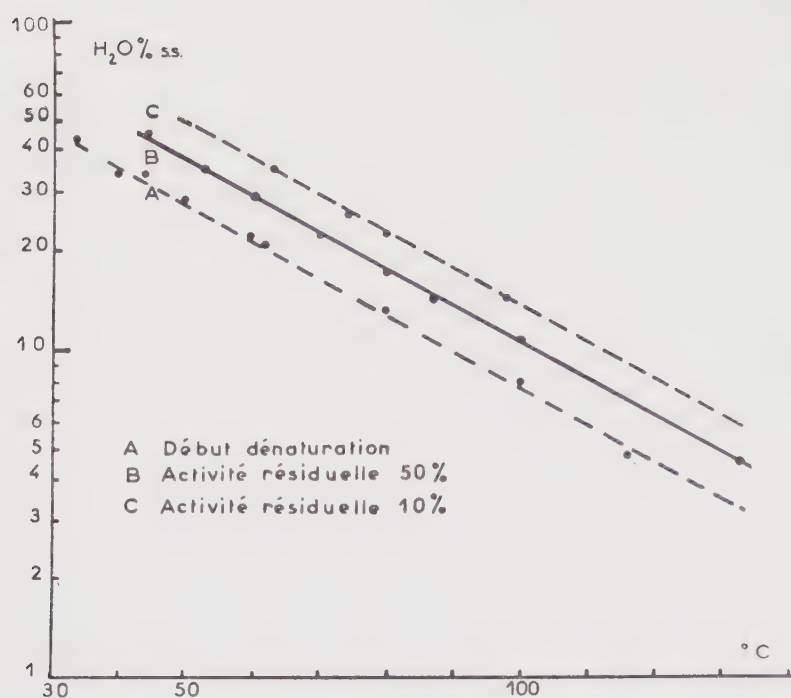


Figure 46 - Relation entre la teneur en eau et la température correspondant à divers taux d'inactivation de la RN-ase extractible du blé après un choc thermique de 30 minutes.

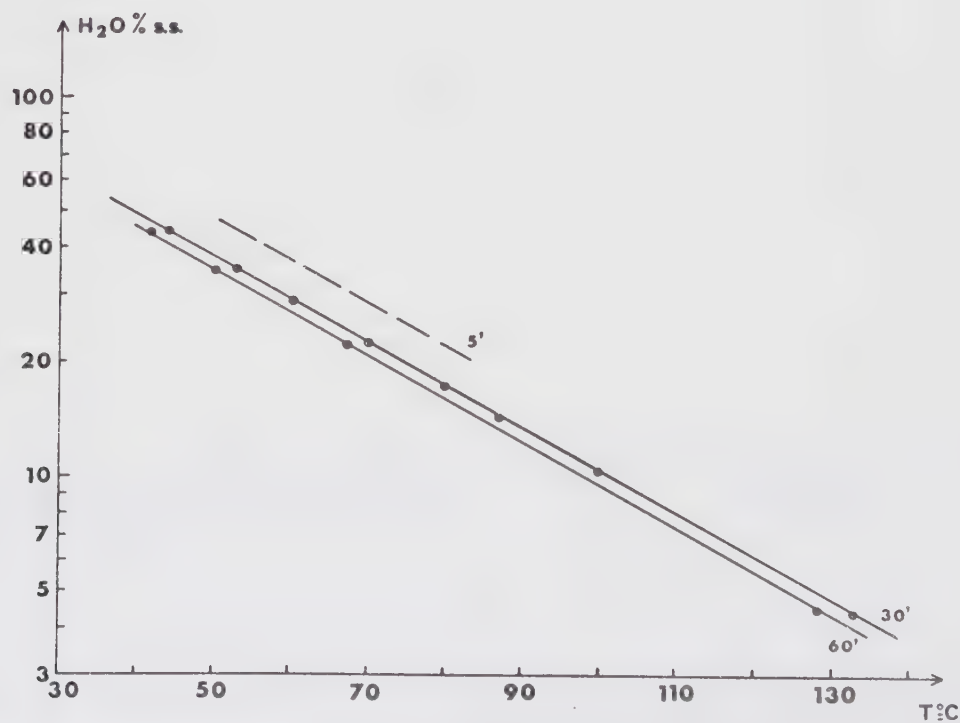


Figure 47 - Relation entre la teneur en eau et la température correspondant à une inactivation de 50% de la RN-ase extractible du blé, après des chocs thermiques de durées diverses.

observation montre que dans la réaction de dénaturation, l'eau solvante joue un rôle considérable, peut-être déterminant, comme cela a déjà été montré pour la plupart des réactions biochimiques (GUILBOT, 1967). Plus la température est faible, plus grande est la proportion d'eau solvante nécessaire à la réaction par rapport à la quantité totale d'eau (fig. 48) autrement dit l'importance relative de l'eau solvante dans le mécanisme réactionnel décroît avec la température.

D. RELATION ENTRE LA TENEUR EN EAU ET LA DUREE.

Des relations linéaires, correspondant à 50 p.100 d'inactivation, qui viennent d'être observées entre la température et le logarithme d'une part de la durée, d'autre part de la teneur en eau, il résulte qu'il doit exister, pour une température donnée, une relation linéaire de la forme : $\log (H_2O) = a \log (\text{durée}) + b$.

Bien que le nombre des résultats expérimentaux permettant de représenter cette relation, soit relativement faible, on vérifie cependant sur la figure 49 qu'il s'agit bien d'une droite.

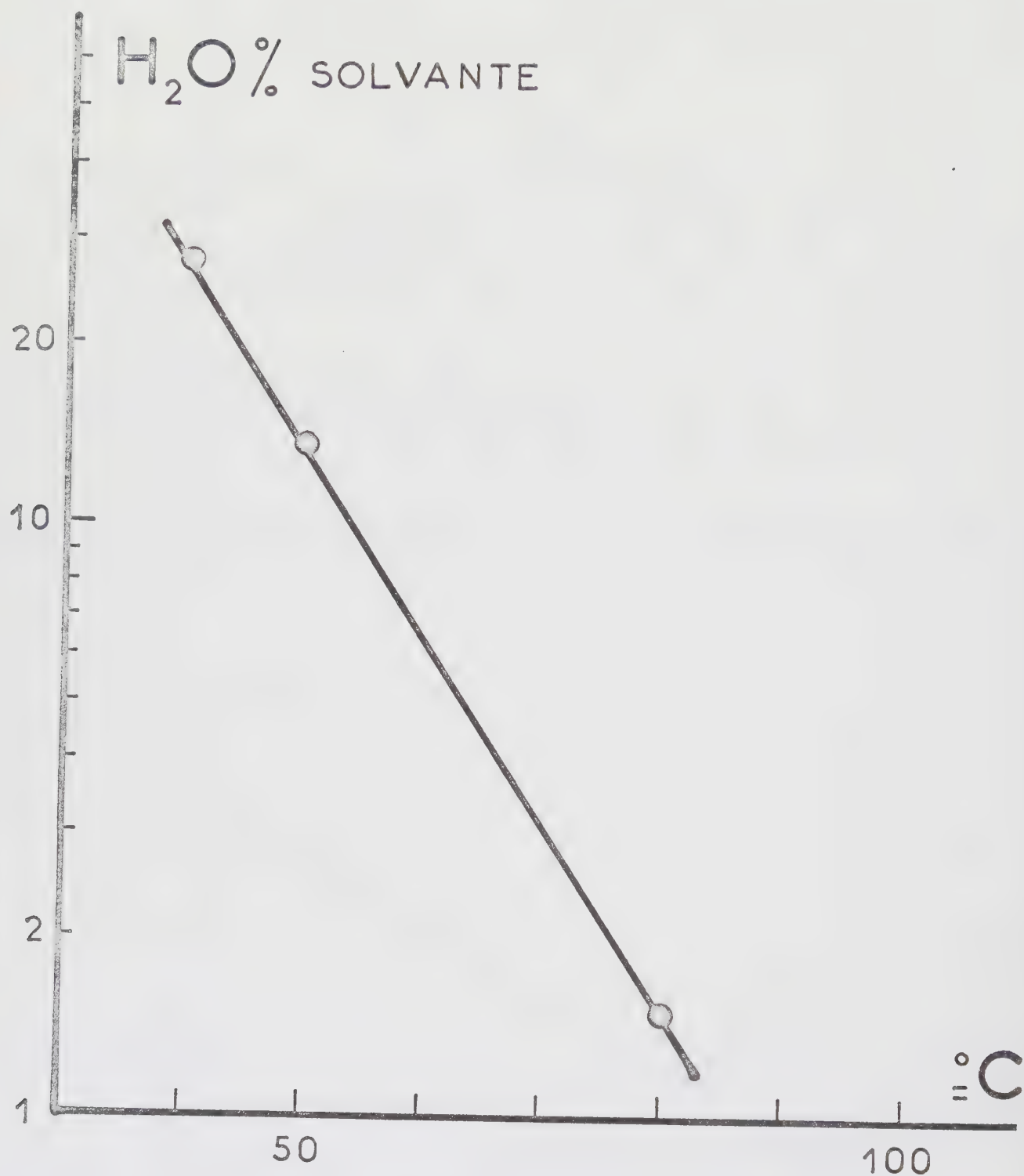


Figure 48 - Relation entre la teneur en eau solvante et les températures correspondantes au début de l'inactivation de la RN-ase extractible du blé après un choc thermique de 30 minutes.

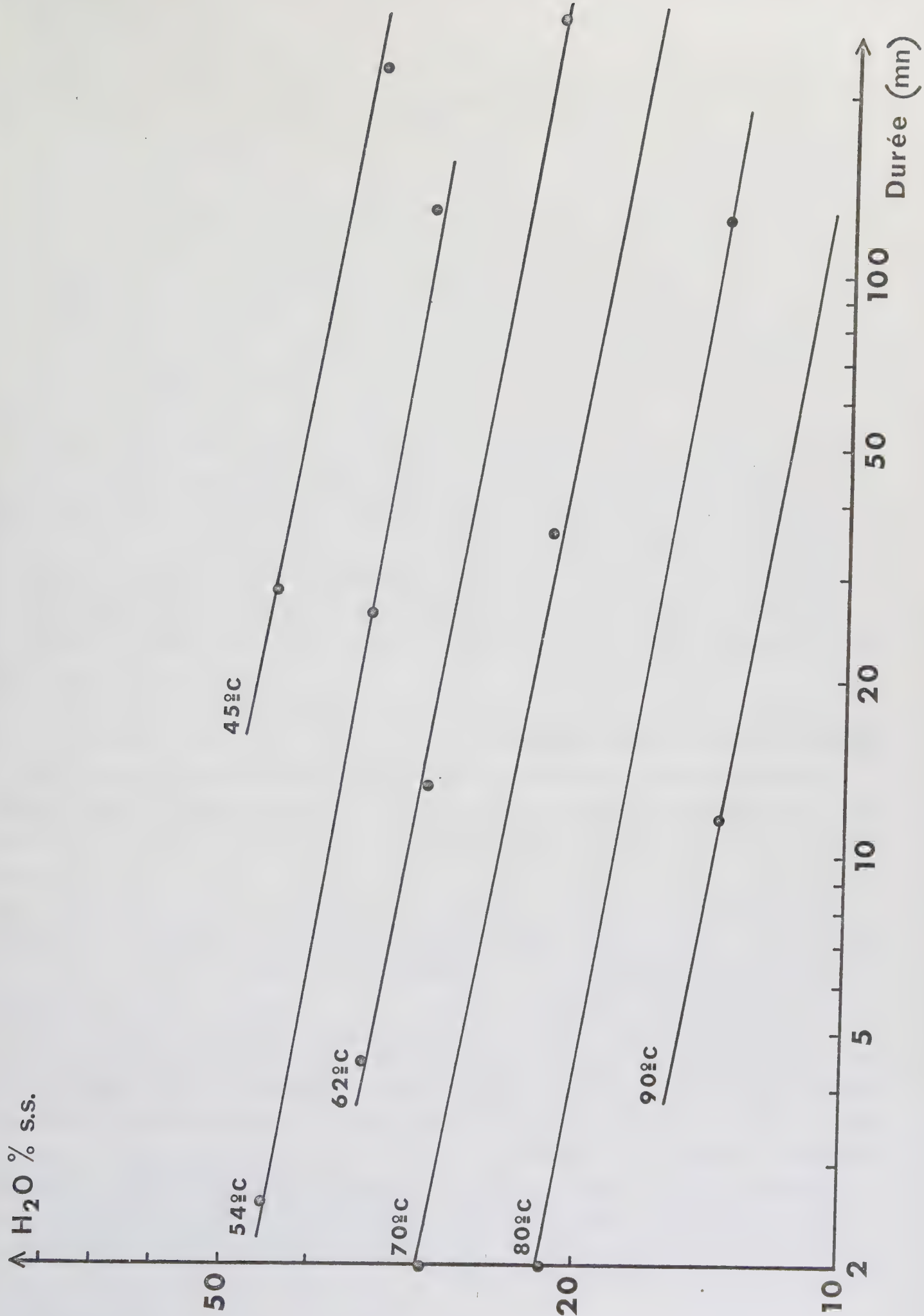


Figure 49 - Relation entre le logarithme de la teneur en eau et le logarithme de la durée du choc thermique permettant d'obtenir dans le cas du blé, 50% de perte de l'activité RNasique extractible, pour diverses températures.

- CONCLUSION GENERALE -

Le travail expérimental a consisté à faire subir dans une enceinte étanche des chocs thermiques à du blé et à de la ribonucléase pancréatique pure, les trois facteurs contrôlés de l'expérience étant la teneur en eau, la température et la durée. L'activité RNasique extractible et le temps moyen de germination dans le cas du blé, l'activité résiduelle dans le cas de la RNase pancréatique ont été ensuite mesurés.

Cette étude aboutit à dégager un certain nombre de résultats sur le rôle primordial que l'eau joue dans la dénaturation des protéines en milieu solide. Ceux-ci nous ont permis d'esquisser les grandes lignes d'une théorie générale relative à la cinétique et au mécanisme de la dénaturation, ainsi que d'envisager diverses applications pratiques dans le domaine du séchage des céréales.

Par ailleurs, elle a exigé la mise au point de plusieurs méthodes - dosage de l'activité RNasique, mesure du temps moyen de germination - qui devraient trouver dans d'autres domaines un large champ d'application.

PRINCIPAUX FAITS MIS EN EVIDENCE.

Les phénomènes suivants, relatifs à la dénaturation des protéines en milieu solide peu hydraté, sous l'effet d'un traitement thermique ne provoquant pas de variation de teneur en eau, ont pu être mis en évidence.

- Généralement les cinétiques observées comportent après une courte période de latence, une première phase de dénaturation rapide, puis une deuxième phase de dénaturation lente, correspondant chacune à des cinétiques de réaction d'ordre 1.
- La somme des durées de la période de latence et de la première phase est du même ordre de grandeur que la durée nécessaire pour obtenir un nouvel équilibre énergétique des liaisons hydrogène dans la substance ; cette durée étant appréciée grâce aux enregistrements hygrométriques effectués pendant le traitement.
- Ces mêmes enregistrements, dont les résultats sont confirmés par des mesures de pression, montrent qu'au cours du chauffage en enceinte étanche, et une fois l'équilibre atteint, la courbe de sorption de la substance ne semble pas avoir changé.

- L'énergie et l'enthalpie d'activation relatives à la deuxième phase sont plus fortes que celles relatives à la première phase.
- Au cours de la deuxième phase, l'énergie, l'enthalpie et l'entropie d'activation passent par des valeurs minimales pour une teneur en eau du milieu de 22 p.100.
- Dans tous les cas, $\Delta S^\ddagger$ et $\Delta H^\ddagger$ sont liés par une relation linéaire unique, permettant de définir une température caractéristique de "changement d'état" assimilable à une monotropie.
- Il semble que la première phase corresponde, d'une part, à un changement irréversible de l'affinité pour l'eau (sorption) intéressant la fraction faiblement liée, d'autre part, à la modification du nombre de liaisons S-S.
- Enfin, il apparaît que la température, la durée, la teneur en eau et le pourcentage de dénaturation, sont des paramètres interdépendants ; en particulier une relation logarithmique existe entre la teneur en eau solvante et la température moyenne du milieu.

Malgré le caractère fragmentaire de ces observations, il est intéressant d'essayer de les réunir dans une théorie générale sur le rôle de l'eau dans les réactions de dénaturation en milieu solide.

ESSAI DE THEORIE GENERALE.

Quand une substance solide, contenant une protéine, est chauffée à teneur en eau constante, la cinétique de la dénaturation irréversible qui a lieu peut se décrire chronologiquement de la façon suivante.

- On observe tout d'abord une courte période de latence correspondant à une mise en équilibre thermique. La dénaturation doit commencer très lentement dès ce stade, mais ne paraît pas décelable avec les méthodes mises en oeuvre.
- Ensuite, apparaît une première phase de dénaturation très rapide. Il se produit alors un remaniement profond de l'état d'équilibre énergétique des liaisons hydrogène, soit entre les macromolécules, soit, et surtout, entre l'eau et la substance. Il en résulte des variations d'H.R.E.. Ces modifications n'affectent pas la quantité d'eau fortement adsorbée sur la protéine : elles intéressent surtout la fraction d'eau fixée qui obéit à la loi de HENRY et l'eau solvante. Elles correspondent vraisemblablement à des variations dans l'énergie de liaison de l'eau, par exemple, par le passage de liaisons du type hydrogène à celles du type VAN der WAALS, sans qu'il y ait rupture complète. Il y a augmentation de la quantité d'eau solvante, plus mobile, plus dispo-

nible, et susceptible de jouer également le rôle d'agent rupteur de liaisons hydrogène.

Ces phénomènes s'ajoutant aux perturbations résultant de l'agitation thermique, entraînent des changements très importants dans les structures de la macromolécule protéique, structures dont on a vu à quel point l'eau constitue un élément essentiel (cf. chapitre I) ; ceci a pour conséquence une dénaturation rapide. Le rôle catalytique important que l'eau joue ainsi a pour effet d'abaisser fortement l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation.

Cependant, au bout d'un certain temps, un nouvel état d'équilibre énergétique des liaisons de l'eau est atteint, l'H.R.E. revient à une valeur proche de celle initialement observée, et la première phase prend fin.

A ce moment, on est en présence de molécules protéiques dont une partie aliquote est déjà dénaturée. Pour celles qui sont encore à l'état natif, les liaisons hydrogène sont en équilibre énergétique ; on assiste alors à une dénaturation lente, due à la seule agitation thermique, cependant catalysée par l'eau solvante apparue précédemment dans le milieu ; l'effet catalytique étant maximal pour une teneur en eau de 22 p.100 (énergie d'activation minimale). Cette valeur optimale de la teneur en eau peut être attribuée à une compétition entre deux effets dus à l'eau : d'une part, pour l'eau solvante, un effet d'agent rupteur de liaison hydrogène ; d'autre part, un effet organisateur, soit direct, soit résultant d'interactions hydrophobes. Cette deuxième phase paraît d'ailleurs être la seule subsistant en milieu sec, où l'agitation thermique constituerait le seul facteur dénaturant.

Par ailleurs, deux observations - la répartition statistique du nombre de molécules dénaturées en fonction de la température et de la teneur en eau, d'une part, la relation linéaire unique entre ΔS^* et ΔH^* , d'autre part - concourent à laisser penser que la dénaturation procède par un mécanisme de tout ou rien, quelle que soit la phase ou la durée considérée.

Autrement dit, en imaginant les molécules enzymatiques réparties dans une phase solide continue, au bout d'un temps déterminé d'action de la chaleur, un certain nombre d'entre elles (nombre répondant à une loi de probabilité normale vis-à-vis du logarithme de la température et de la teneur en eau) a subit, à la température constante de 60°C,

un changement d'état brusque. Ce changement est comparable thermodynamiquement à une transition monotropique et leur fait perdre leurs propriétés spécifiques.

Au bout d'un certain temps (fin de la première phase), le changement dans la vitesse du phénomène est dû à une modification du rôle de l'eau, mais ce schéma "à deux états" demeure le même.

Telle est la représentation de la dénaturation en milieu solide, et en fonction de la teneur en eau, à laquelle nous conduisent nos résultats expérimentaux.

Cependant ces résultats ne dépendent ni de la méthode choisie pour apprécier la dénaturation (mesure de l'activité RNasique, mesure du T_m), ni du degré de pureté de l'enzyme, ni de l'état de la protéine (solide, en solution). De plus, beaucoup d'observations trouvées dans la littérature sont en accord avec les nôtres. Aussi est-il logique de penser que le schéma proposé puisse avoir une portée générale et doive être caractéristique du phénomène de dénaturation thermique.

Il est juste de souligner que certaines questions sont encore insuffisamment précisées, en particulier l'évolution du taux de dénaturation atteint au cours de la première phase en fonction de la température et le rôle des liaisons disulfures.

Ces questions, et d'autres qui ont été indiquées au long de cette étude peuvent faire l'objet, semble-t-il, de travaux ultérieurs susceptibles d'étayer le schéma proposé.

Mais indépendamment de ces aspects fondamentaux, il faut encore évoquer ici les applications pratiques que ces travaux permettent d'envisager.

APPLICATIONS TECHNOLOGIQUES ENVISAGEES.

Les applications pouvant découler de cette étude se situent sur deux plans.

D'une part, la connaissance plus précise des phénomènes se produisant en milieu solide doit permettre une meilleure réalisation des opérations technologiques comportant un chauffage telles que : séchage, cuisson, stérilisation, blanchiment.

Bien entendu, dans le cas du séchage, les phénomènes sont encore plus complexes, puisqu'il y a variation simultanée de la température et de la teneur en eau, contrairement à ce qui est réalisé dans nos essais :

il est nécessaire de définir expérimentalement quelle peut être la part relative des deux phases de dénaturation dans la cinétique de séchage. Il semble, par ailleurs que la connaissance des relations température - teneur en eau doive permettre une prévision plus rationnelle des diagrammes de séchage.

D'autre part, les deux critères de dénaturation étudiés - RNase et T_m - semblent pouvoir constituer deux tests intéressants de l'état d'altération des semences. A la suite de deux sondages encourageants qui ont été faits dans cette voie, il apparaît en effet que la RNase constitue un des critères les plus sensibles de l'altération quand on étudie le séchage du blé et du maïs. Ces travaux seront publiés par ailleurs et feront l'objet d'autres développements.

Ainsi, ces deux méthodes offrent des perspectives intéressantes sur le plan des applications ; néanmoins de nombreux problèmes se posent encore, en particulier le fait que l'activité RNasique d'un blé sain semble subir de larges fluctuations. Il est nécessaire également d'étendre cette recherche à diverses autres céréales et aussi, sans doute, de simplifier les méthodes pour qu'elles puissent avoir une application pratique.

Malgré toutes les difficultés et les imperfections signalées, nous espérons que ces travaux, au cours desquels on s'est attaché à ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois, pourront contribuer à définir des lois générales permettant de déterminer à partir de quelques résultats expérimentaux, le degré de dénaturation des protéines dans les milieux complexes.

Ce sera là l'illustration de l'intérêt que présentent des travaux assez théoriques pour le progrès des industries agricoles et alimentaires.

ANNEXE

QUELQUES ASPECTS PARTICULIERS DES DISTRIBUTIONS

DES DUREES DE GERMINATION

La mesure du temps moyen de germination suppose par définition même que l'on distingue deux sous-populations dans les échantillons étudiés :

- une sous-population de grains ne germant pas et qui doivent être éliminés ;
- une sous-population de grains vivants qui germent chacun au bout d'un temps défini. L'effectif de cette sous-population s'identifie au pouvoir germinatif du lot.

L'étude de la distribution des durées de germination, effectuée selon le mode opératoire décrit dans les méthodes expérimentales, aboutit à mesurer la moyenne (T_m) et la variance.

Cette distribution est sensiblement normale, ainsi que le montrent les droites obtenues sur les graphiques de probabilités.

Il s'avère que certains traitements qui altèrent les grains (entreposage, choc thermique...) modifient plus ou moins profondément cette population, parfois en augmentant le nombre de grains qui ne germent pas, généralement en allongeant le T_m ; la mesure de celui-ci n'est réellement intéressante que si le nombre de grains ne germant pas demeure faible ; de plus la variation de l'effectif total qui en résulte rend beaucoup plus difficile l'application de certains tests statistiques et en particulier l'analyse de la variance.

Quant à la variance, elle subit une évolution qui est examinée plus en détail dans le cas des chocs thermiques étudiés dans ce travail.

A. EVOLUTION DE LA VARIANCE.

On constate à la lecture du tableau 7. que la variance n'est pas constante dans l'ensemble des échantillons étudiés : les traitements de conditionnement et de chocs thermiques la modifient largement.

En particulier, la figure 50 montre que l'écart-type de la distribution (proportionnel à la pente des droites) croît en fonction de la moyenne pour une série de chocs donnés.

La variance semble liée à deux paramètres :

- d'une part, elle passe par une valeur maximale en fonction de la durée du choc thermique (figure 51) ;

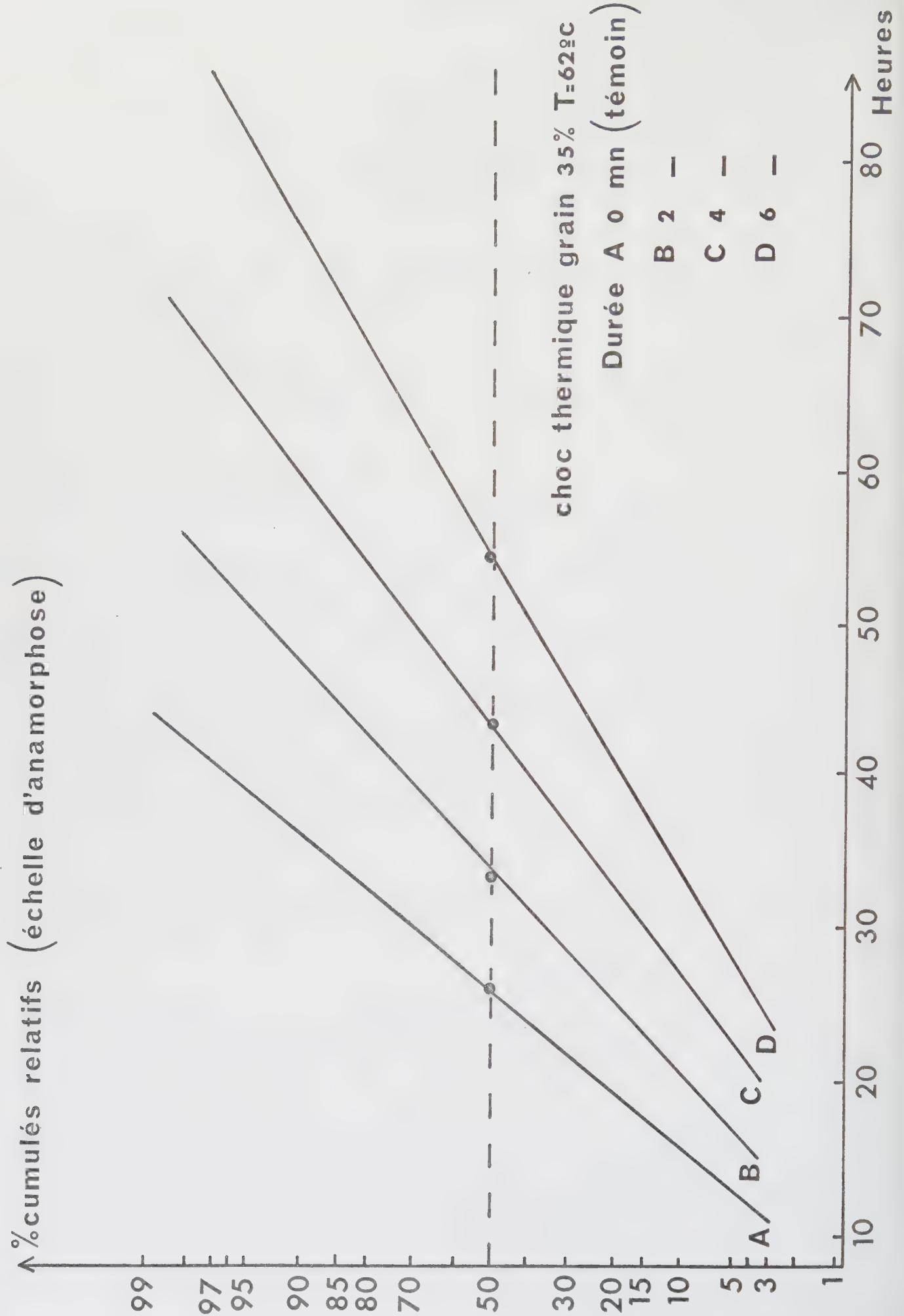


Figure 50 - Distribution des durées de germination, représentées sur une échelle de probabilité, pour des échantillons de grains ayant subi un choc thermique à une température de 62°C et à une teneur en eau de 35% s.s.

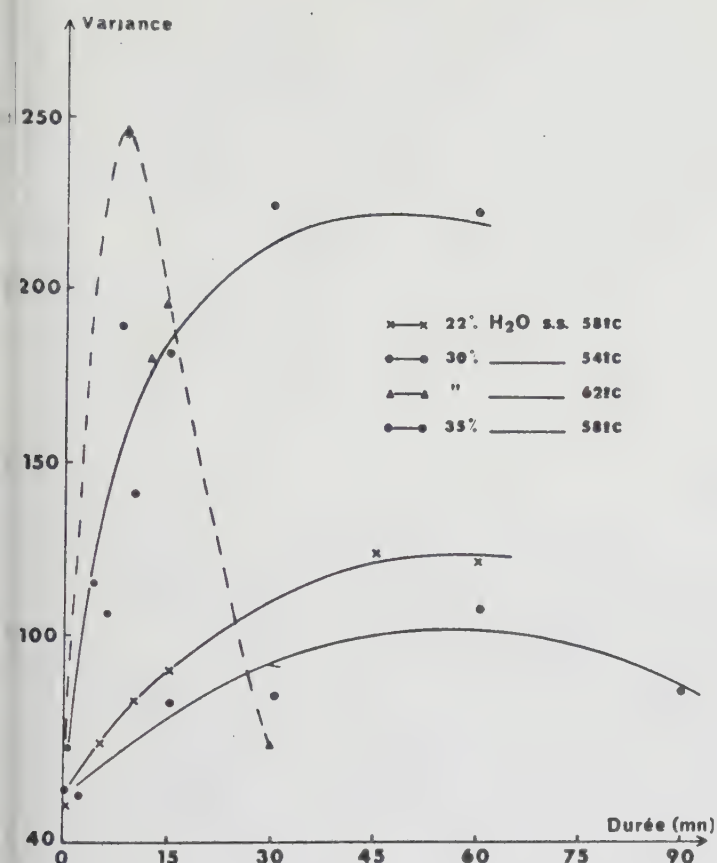
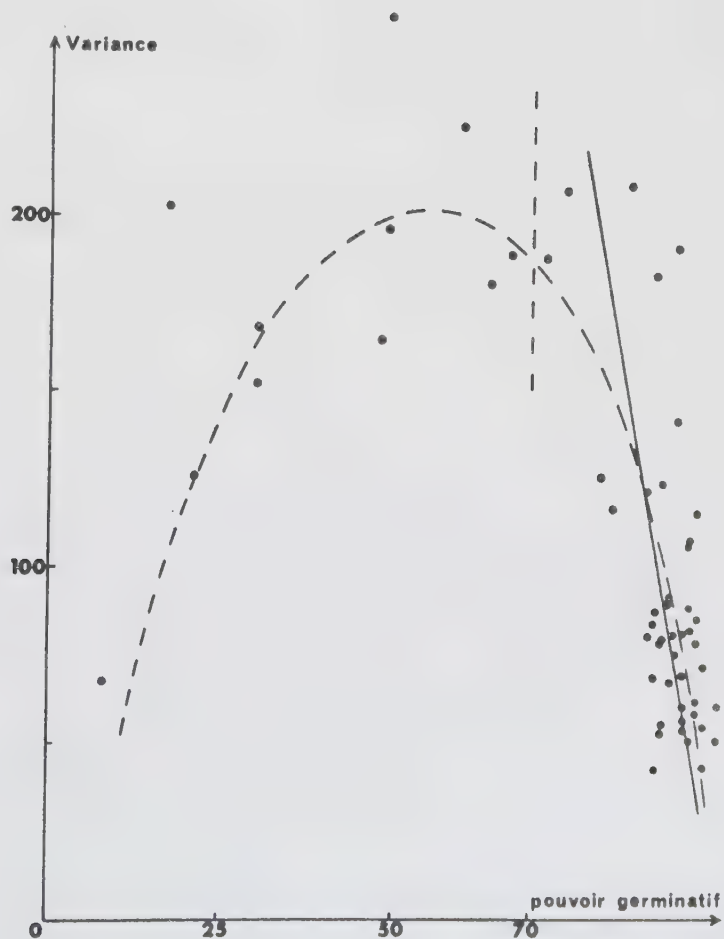


Figure 51 - Evolution de la variance des distributions des temps de germination en fonction de la durée du choc thermique effectué dans diverses conditions de température et de teneur en eau.

Figure 52 - Evolution de la variance des distributions des temps de germination, en fonction du pouvoir germinatif des échantillons.



- d'autre part, elle est liée au pouvoir germinatif, c'est-à-dire à l'importance de l'effectif vivant dans l'échantillon. Figure 52.

On constate que le nuage de points semble se grouper sur une courbe d'allure parabolique. Cependant si l'on ne considère que la fraction de p.g. supérieur à 70 p.100, on peut admettre que l'on a une relation sensiblement linéaire, la variance augmentant très rapidement au fur et à mesure que le p.g. diminue. Les différences observées sont largement significatives comme le montre le test de F : sur la fig. 52 le trait pointillé marque la limite au-delà de laquelle tous les points représentent des différences significatives à 1°/00 avec les témoins (blés non choqués).

B. EVOLUTION DU COEFFICIENT DE VARIATION.

Après avoir constaté que la variance évolue en fonction des différents traitements, sachant que le Tm évolue également d'une façon décrite en détail dans le chapitre III, il est intéressant de voir si la variabilité relative des échantillons change ; pour en avoir une idée, le coefficient de variation $v = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \times 100$ a été calculé pour chaque essai : le tableau 21 présente les résultats. On peut en dégager les remarques suivantes :

- le coefficient de variation croît avec la teneur en eau à laquelle le grain a été amené avant le choc thermique. (Rappelons que la teneur en eau lors de la mise en germination est toujours de 14 p.100) ; ceci est également vrai pour le grain non choqué. Il se situe environ dans les limites suivantes :

Teneur en eau °/0	Coeff. variation °/0
14	13 à 19
22	16 à 22
30	20 à 29
35	17 à 43

Ceci indique que plus les grains sont humides au moment du traitement thermique, plus les durées de germination ultérieure sont dispersées.

Il semble par ailleurs que :

- le coefficient de variation décroît quand augmente la température du choc à teneur en eau et durée de choc égales ;
- le coefficient de variation n'évolue pas ou diminue très légèrement quand augmente la durée du choc.

Le facteur de variabilité le plus important semble donc être la teneur en eau. Il est à noter que les coefficients de variation qui vont de 13 à 43 p.100 environ, ne sont pas surprenants, quoique assez importants. Certaines distributions d'éléments biologiques ont des coefficients de cet ordre (selon LISON, 1958).

TABLEAU 21 - Coefficient de variation* des distributions de durée de germination du grain de blé chauffé à teneur en eau constante, en fonction de la teneur en eau, de la température et de la durée du traitement .

H ₂ O °/°	Temp °C	Durée (mn)															
		0	2	3	4	5	6	8	9	10	12	15	30	45	60	75	90
14	65	19								19		16	16		13		
	72	-	-	15	-	13	-	-	-	15	-	13	15	-	-	-	-
22	58	17	-	-	-	-	-	-	-	20	-	21	20	22	21	-	-
	62	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	20	18	-	-	-	-
30	54	30	-	-	-	-	-	-	22		21	23	22	-	24	-	20
	62	-	-	-	-	-	-	-	29	-	20	20	10	-	-	-	-
35	45	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-	27	-	26
	50	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	33	21	13	26	-
	54	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	25	23	30	-	-
	56	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	19	-	17	-
	58	36	26	-	38	-	30	37	-	28	-	25	21	17	17	-	-
	62	29	43	-	31	-	30	21	-	21	-	-	-	-	-	-	-

* Le coefficient de variation $v = \frac{S}{m} \times 100$ est exprimé en °/° ; les valeurs données, arrondies à l'unité la plus proche, ont été calculées à partir des données des tableaux

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.A.C.C., 1962. Cereal Laboratory Methods. 7e ed.
- ALBRECHT W.J., MUSTAKAS G.C., Mc GHEE J.E., 1966. Rate studies on atmospheric steaming and immersion cooking of soybeans. Cereal Chem., 43, (4), 400-407.
- ALGIE J.E., WATT I.C., 1962. Stabilization of keratin structure by incorporated water. Nature, Lond., 193, 972.
- ALLEN F.W., CRESTFIEL A.M., SMITH K.C., 1955. The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast. J. Biol. Chem., 216, 185-193.
- ALTMAN R.L., BENSON S.W., 1960. The sorption of water by native and denatured egg albumin. J. Phys. Chem., 64, 851-855.
- ANSON M.L., MIRSKY A.E., 1934. The equilibrium between active native trypsin and inactive denatured trypsin. J. Gen. Physiol., 17, 393-398.
- BACHRACH H.L., BREESE S.S. et al., 1957. Inactivation of Foot and Mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde (23148). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95, 147-152.
- BARKER H.A., 1934. The effect of water content upon the rate of heat denaturation of crystallizable egg albumin. J. Gen. Physiol., 17, 21-34.
- BECKER H.A., SALLANS H.R., 1956. A study of the relation between time, temperature, moisture content, and loaf volume by the bromate formula in the heat treatment of wheat and flour. Cereal Chem., 33, 254-265.
- BENESCH R., BENESCH R.E., 1952. Reactions of thiols with organic mercury compounds. Arch. Biochem. Biophys., 38, 425-441.
- BIMBENET J.J., GUILBOT A., 1966. Modifications biochimiques et physicochimiques au cours du séchage. Chimie et Industrie-Génie chimique, 96, (4), 1-12.
- BOOTH R.G., 1948. Some characteristics of the nuclear enzymes of wheat. In "Le Pain". Journées scientifiques du C.N.R.S., 137-142.
- BRANDTS J.F., 1965. The nature of the complexities in the ribonuclease conformational transition and the implications regarding clathrating. J. Amer. Chem. Soc., 87, 2759-2760.
- BRANDTS J.F., 1967. Heat effects on proteins and enzymes - in Thermobiology, de A.H. ROSE (Academic Press, Londres).
- BRUNAUER S., 1945. The adsorption of gases and vapours. I - Physical adsorption. (Princeton University Press, Princeton).
- BURGES H.D., EDWARDS D.M., BURREL N.J., CAMMEL M.E., 1963. Effect of storage temperature and moisture content on the germinative energy of malting barley, with particular reference to high temperature. J. of the Sci. of Food and Agriculture, 8, 580-583.
- CARTWRIGHT T.E., LAUFFER M.A., 1958. Temperature effects on Botulinum A Toxin - (24033) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 327-330.

- COME D., 1967. L'inhibition de germination des graines de pommier (*Pirus Malus L.*) non dormantes - Rôle possible des phenols tegumentaires. *Ann. Sci. Nat., Bot., VIII*, 371-478.
- COME D., 1968. Problèmes de terminologie posés par la germination et ses obstacles. *Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét.*, 14, (1), 3-9.
- DAOUST D.R., EL-BISI H.M., LITSKY W., 1965. Thermal destruction kinetics of a lactic streptococcal bacteriophage. *Applied Microbiology*, 13, (3), 478-485.
- DAUPHIN J., 1963. Les différentes formes de stockage des céréales et leur évolution depuis 1950. Journées d'études sur la conservation des grains (I.T.C.F.). Maison de la Chimie. Paris (14 mai).
- DAWES E.A., 1962. Quantitative problems in biochemistry - (Livingstone, Londres).
- DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. *Ann. Technol. Agric.*, 11, (3), 175-218.
- DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réaction enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. *Ann. Technol. Agric.*, 11, (4), 275-317.
- DUCHESNE J. 1964. The structure and properties of biomolecules and biological systems. *Advances in Chemical Physics - Vol. VII - Interscience Publishers (London)*.
- DURAND V., 1953. Germination comparée du riz dans l'eau et dans l'air humide à différentes températures. *C.R. Soc. Biol.* 457-460.
- ELEY D.D., LESLIE R.B., 1964. Adsorption of water on solid proteins with special reference to haemoglobin - in *The structure and properties of biomolecules and biological systems. Advances in chemical physics. VII par DUCHESNE (Interscience Publishers)*.
- EMSCHWILLER G., 1951. *Chimie Physique*, (P.U.P., Paris).
- EVENARI M., 1957. Les problèmes physiologiques de la germination. *Bull. de la Soc. Française de Physio. Végét.*, 3, (4), 105-136.
- EYRING H., 1935. The activated complex in chemical reaction. *J. Chem. Physics*, 3, 107-115.
- EYRING H., STEARN A.E., 1939. The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. *Chem. Rev.*, 24, 253-270.
- FOSS J.G., SCHELLMAN J.A., 1959. The thermal transition of ribonuclease in urea solution. *J. Phys. Chem.*, 63, 2007-2012.
- FRANK H.S., EVAN M.W., 1945. *J. Chem. Phys.*, 13, 507.
- GAJEWSKA E., SHUGAR D., 1955. Kinetics of heat inactivation of ribonuclease. *Bull. Acad. Polon. Sci.* III, (4), 117-121.
- GAJEWSKA E., SHUGAR D., 1956. The heat inactivation of ribonuclease in the presence of foreign proteins. *Bull. Acad. Polon. Sci.* IV, (5), 157-162.

- GINOZA W., ZIMM B., 1961. Mechanisms of inactivation of deoxyribonucleic acids by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 639-659.
- GEDDES W.F., 1929. Chemical and physico-chemical changes induced in wheat and wheat products by elevated temperature - I. *Can. J. Research*, 1, 528-558.
- GEDDES W.F., 1930. Chemical and physico-chemical changes induced in wheat and wheat products by elevated temperature - II. *Can. J. Research*, 2, 65-90.
- GODON B., NINOT D., RICHARD H., 1966. Enseignement de recherche sur les sciences de la nutrition (C.N.E.R.N.A.) - Méthodes de séparation et de caractérisation des protéines. Versailles - octobre 1966.
- GREGG S.J., SING K.S.W., 1967. Adsorption surface area and porosity. (Academic Press, London).
- GUARDIA E.J., HAAS G.J., 1967. Influence of water binders on the activity and thermal inactivation of lipase. *J. Agr. Food. Chem.*, 15, (3), 412-416.
- GUILBOT A., LINDENBERG A.B., 1960. Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. *Biochem. Biophys. Acta.*, 39, 389-397.
- GUILBOT A., POISSON J., 1963. Conditions de stockage et durée de conservation des grains. Journées d'études sur la conservation des grains (I.T.C.F.). Maison de la Chimie. Paris (14 mai).
- GUILBOT A., 1964. Les méthodes biochimiques de contrôle analytique dans les industries de céréales. Mises au point de chimie analyt. pure appl., 1-40, 12e série (Masson, Paris).
- GUILBOT A., 1967. Activités enzymatiques en milieu peu hydraté. *Annales Nut. et Alim.*, 21, B 87 - B 112.
- GUILBOT A., 1968. Le dosage rapide de l'eau dans les grains. *Supplément du Producteur Agricole Français*, 28.
- GUILBOT A., LYSAK J., MULTON J.L., 1968. Badania intensywnego suszenia ziarna pszenicy. *Biuletyn Centralnego Laboratorium*, 12, (1), 13-20.
- GUILBOT A., MULTON J.L., 1968. Les problèmes de conservation des céréales. Rapports de l'Association Internationale de Chimie Céréalière. Sixième session. Juin 1968, 47-54.
- GUILBOT A., 1968 et 1969. Communication personnelle.
- GUY E.J., VETTEL H.E., PALLANSCH M.J., 1967. Denaturation of cottage cheese whey proteins by heat. *J. Dairy Sci.*, 50, (6), 828-832.
- HAGBERG S., 1960. A rapid method for determining alpha-amylase activity. *Cereal Chem.*, 73, 218.
- HARRIS J.I., 1956. Effect of urea on trypsin and alpha-chymotrypsin. *Nature*, 177, (4506), 471-473.
- HARRINGTON J.F., 1962. The effect of temperature on the germination of several kinds of vegetable seeds. XVI th. Intern. Horticult. Cong. (Bruxelles), II, 435-441.

- HARRISON K.R., DOARKS P.F., GREER E.N., 1969. Detection of heat damage in dried wheat. Milling, 151, 37-38.
- HERMANS J.Jr., SHERAGA H.A., 1961. Structural studies of ribonuclease - V. Reversible change of configuration. J. Amer. Chem. Soc., 83, 3283-3292.
- HIATT C.W., 1964. Kinetics of the inactivation of viruses. Bacteriological Reviews, 28, (2), 150-163.
- HORNIBROOK J.W., 1952. Protective effect of moisture on denaturation of human serum albumin by heat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 534.
- HUTCHINSON J.B., 1944. The drying of wheat - Part. 3 - The effect of temperature on germination capacity. J. Soc. Chem. Ind., 63, 104-107.
- HUTCHINSON J.B., BOOTH R.G., 1946. Drying of wheat - IV - Phosphatase activity as an index of heat damage in cereals, J. Soc. Chem. Ind., 65, 235.
- JAVILLIER M., POLONOWSKI M. et al. 1963. Traité de biochimie générale. Tome I, fasc. 2 : composition chimique des organismes. (Masson, Paris).
- JOLY M., 1965. A physico-chemical approach to the denaturation of proteins. (Academic Press, New-York).
- KALNITSKY G., HUMMEL J.P., RESNICK H. et al., 1959. The relation of structure to enzymatic activity in ribonuclease. Ann. of New-York Acad. Sci., 542-569.
- KAPLAN C., 1958. The heat inactivation of Vaccinia virus. J. Gen. Microbiol. 18, 58-63.
- KAUZMANN W., 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. Adv. Protein Chemistry, 14, 1.
- KLOTZ I.M., 1958. Protein hydration and behavior. Sciences, 128, 815-822.
- KLOTZ I.M., 1960. Non-covalent bonds in protein structure. Brockhaven Symp. Biol., 13, 25.
- KLOTZ I.M., 1965. Cooperative interactions of bound ions and SH groups in hemerythrin. Federat. Proc., 24, (2).
- KLOTZ I., 1967. Energy changes in biochemical reactions. (Academic Press, N.Y.).
- KOKA M., MIKOLAJCIK E.M., GOULD I.A., 1968. Spectrophotometric method for determination of heat-activated sulphhydryl groups of skimmilk. J. Dairy Sci., 51, (2), 217-219.
- KOKA M., MIKOLAJCIK E.M., 1967. Kinetics of thermal destruction of bacteriophages active against Streptococcus cremoris. J. Dairy Sci., 50, (7), 1025-1031.
- KOMEMUSHI S., TAKADA N., TERUI G., 1966. On the change of death rate constant of bacterial spores in the course of heat sterilisation - I. (en japonais). J. Fermentation Technology, 44, (8), 543-551.
- KOMEMUSHI S., TAKADA N., TERUI G., 1966. On the change of death rate constant of bacterial spores in the course of heat sterilisation - II. (en japonais). J. Fermentation Technology, 45, (8), 764.

- KOTLJAR G.I., LEBEDEVA G.Ja., ZHURAVSKAJA T.G., 1966. Les groupes sulfhydryles et les ponts disulfures dans les protéines du grain de blé chauffé (en russe). *Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved. Pischev. Tekhnol.*, 2, 33-35.
- KOTOWSKI F., 1926. Temperature relations to germination of vegetable seeds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 23, 176-184.
- KREYGER J., 1959. Recherches sur la conservation des orges de brasserie. *Bull. de l'Ecole Française de Meunerie*, 169, 19.
- KUNITZ M., 1948. The kinetics and thermodynamics of reversible denaturation of crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 32, 241-263.
- LAUFFER M.A., CARNELLY H.L., 1945. Thermal destruction of influenza A virus hemagglutinin. I. The kinetic process. *Arch. Biochem*, 8, 265.
- LEFFLER J.E., 1955. The enthalpy-entropy relationship and its implications in organic chemistry. *J. Org. Chem.*, 10, 1202-1232.
- LEWIS S., 1890. *Arch. Exp. Path. u. Pharmakol*, 26, 341.
- LICCIARDELLO J.J., RIBICH C.A. et al., 1967. Kinetics of the thermal inactivation of type E *Clostridium botulinum* toxin. *Applied Microbiol.*, 15, (2), 344-349.
- LINDENBERG A.B., ZUILI S., 1952. Variation du pouvoir solvant de l'eau cellulaire en fonction de l'incrément diélectrique des molécules solutés. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 234, 2573.
- LINKO P., 1960. The biochemistry of grain storage. *Cereal Science Today*, 5, (10), 302-306.
- LISON L., 1958. *Statistique appliquée à la biologie expérimentale*. (Gauthier-Villars, Paris).
- LONCIN M., 1961. *Les opérations unitaires du Génie Chimique* (Dunod, Paris).
- LUMRY R., BILTONEN R., BRANDTS J., 1966. Validity of the two state hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers*, 4, (8), 917-944.
- MOORE W.J., 1965. *Chimie physique* (Dunod, Paris).
- MULLANEY P.F., 1966. Dry thermal inactivation of trypsin and ribonuclease. *Nature*, 210, (5039), 953.
- MULTON J.L., GUILBOT A., 1967. Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau. *Ann. Techn. Agric*, 16, (1), 5-25.
- MULTON J.L., GUILBOT A., LECOURBE P., 1967. Une nouvelle méthode d'appréciation de la viabilité du blé : la mesure du temps moyen de germination. *C.R. Acad. Sci.*, 264, 1714-1717.
- MULTON J.L., LECOURBE P., GUILBOT A., 1968. Méthode d'appréciation de la détérioration biologique des grains par mesure du temps moyen de germination. 1st International Biodeterioration, Symposium (Southampton), in *Biodeterioration of materials*, par WALTERS A.M. et ELPHICK J. (Elsevier, Londres).

MULTON J.L., 1969. 2ème thèse.

NEURATH H., 1963. The proteins. Composition, structure and function. Second edition. Academic Press, (New York).

NORTHROP J.H., 1932. *Ergeb. Enzymforsch.*, 1, 302.

OBOLENSKY G., 1957. Recherches sur quelques stimulations fonctionnelles chez les plantes par les ultra-sons. Thèse de doctorat, Univ. de Paris.

PASCAL P., 1953. Notions élémentaires de chimie générale à la lumière des théories modernes (Masson, Paris).

PAULING L., 1960. Chimie générale (Dunod, Paris).

PENCE J.W., MOHAMMAD A., MECHAM D.K., 1953. Heat denaturation of gluten. *Cereal Chem.*, 30, 115-126.

POLLARD E.C., 1964. Thermal effects on protein, nucleic acid, and viruses, in The structure and properties of biomolecules and biological systems, par DUCHESNE. (Interscience Publishers, Londres).

POLLARD E.C., REAUME M., 1951. Thermal inactivation of bacterial viruses. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 32, (278), 278-287.

POWELL W.F., 1964. Cité par POLLARD, in The structure and properties of biomolecules and biological systems. Edited by DUCHESNE J. (Interscience Publishers).

PRIVALOV P.L., MREVLISCHVILI G.M., 1967. Hydratation des macromolécules à l'état naturel et dénaturé. *Biofizika*, 12, (1), 22-29.

REED G., 1966. Enzymes in food products. (Academic Press, New York).

ROBERTS E.H., 1960. The viability of cereal seed in relation to temperature and moisture. *Ann. Bot.*, 24, 12-31.

ROBERTSON D.W., LUTE A.M., GARDNER, 1939. Effect of relative humidity on viability, moisture content and respiration of wheat, oats, and barley seed in storage. *J. Agric. Res.*, 59, 281-291.

ROSE A.H., 1967. Thermobiology. Academic Press (Londres).

ROSS S., OLIVIER J.P., 1964. On physical adsorption (Interscience Publishers).

ROTHER M., 1958. Eigenschaften und Reaktionsverhalten pflanzlicher Samenlipasen im natürlichen Milieu. II. Ernährungssuchung, 3, (1), 41-51.

ROTHER M., 1967. Inactivation of enzymes by heat in connection with rice bran stabilization. 3ème conférence "International Problems of Modern Cereal Processing and Chemistry", Bergholz - Rehbrücke.

SCHERAGA H.A., 1965. The effect of solutes on the structure of water and its implications for protein structure. *Ann. of the New-York Acad. of Sci.*, 125, 2, 253-276.

SCHERAGA H.A., 1963. Intramolecular bonds in proteins. II. Non covalent bonds, in The proteins, édité par NEURATH M. - Volume I (Academic Press, New-York).

- SCOTT W.J., 1957. Water relations of food spoilage micro-organisms. *Advances in food research*, VII, 83-127 . (Academic Press, N.Y.).
- SISLER E.C., JOHNSON W.H., 1965. Effect of temperature and moisture on the inactivation of O - diphenol oxidase - *Plant and Cell. Physiol.* (Tokyo) 6, (4), 645-651.
- SOKOLOV N.D., 1965. De la théorie de la liaison hydrogène (en russe). *Ann. Chim.*, 10, 497-515.
- SOMMER H., SOMMER E.W., 1932. Botulinus toxin. VI. The destruction of botulinus toxin by heat. *J. Infect. Diseases*, 51, 243-253.
- STACKELBERG M., MÜLLER H.R., 1954. Solid gas hydrates. II. Structure and stereochemistry. *Z. Elektrochem.*, 58, 25-39.
- STEARNS A.E., 1938. The theory of absolute reaction rates applied to enzyme catalysis. *Ergeb. Enzymforsch.*, 7, 1-27.
- STEARNS A.E., 1949. Kinetics of biological reactions with special reference to enzymic processes, in *Advances in enzymology*, 9, (25), 25-74.
- STRICKS W., KOLTHOFF I.M., TANAKA N., 1954. Polarographic and amperometric mercurimetric determination of disulfide groups in cysteine, oxydized glutathione and proteins. *Anal. Chem.* 26, 299-303.
- SUARDET R., 1965. *Thermodynamique* . (Baillièrre, Paris).
- TABORSKY G., 1959. Chromatography of ribonuclease on carboxymethyl cellulose columns. *J. Biol. Chem.*, 234, (10), 2652-2656.
- TOUZARD J., 1958. Influence de diverses conditions constantes de température et d'humidité sur la longévité des graines de quelques espèces cultivées. *C.R. du 15e Congrès International d'Horticulture*.
- WARBURG O., 1948. *Wasserstoffübertragende Fermente*. (Saenger, Berlin).
- WHITE F.H., 1961. *J. Biol. Chem.*, 236, 1353. Cité par NEURATH, vol. 1, 398.
- WHITE F.H., ANFINSEN C.B., 1959. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81, 515. Cité dans Privat de Garilhe, P. 177.
- WOESE C.R., 1956. Heat inactivation studies on animal viruses - I. The inactivation of virus hemagglutinin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 63, 212-220.
- WOESE C., 1960. Thermal inactivation of animal viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 83, 741-751.
- YON J., 1969. *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*. (Hermann, Paris).
- ZOTTOLA E.A., MARTIN E.H., 1966. Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 49, 1338-1342.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

L'ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DANS LES CEREALES ;

METHODE DE DOSAGE.

Vu et approuvé

Paris, le 13 janvier 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Marc ZAMANSKY

Vu

et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Robert MALLET

